



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**EFFECTO DE LA EXPRESION DE SNAI1 EN FIBROBLASTOS
ASOCIADOS A TUMORES DE COLON**

TESIS DOCTORAL

**ALBERTO HERRERA TEJERO
MADRID 2016**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA**



**EFFECTO DE LA EXPRESION DE SNAI1 EN FIBROBLASTOS
ASOCIADOS A TUMORES DE COLON**

TESIS DOCTORAL presentada por

ALBERTO HERRERA TEJERO

Licenciado en Biología,

Para optar al grado de Doctor.

Directores de tesis:

DRA. CRISTINA PEÑA MAROTO

DR. FÉLIX BONILLA VELASCO

Universidad Autónoma de Madrid

IIS Puerta de Hierro-Majadahonda

Esta tesis doctoral, realizada en el Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro-Mahadahonda, ha sido financiada por Instituto de Salud Carlos III-FEDER (RTICC-RD12/0036/0041), la Fundación Banco Santander, el Instituto de Salud Carlos III-Fondo de Investigación Sanitaria (PI12/02037), la Fundación Científica de la AECC (Convocatoria 2009), la Comunidad de Madrid S2010/BMD-2344 y por el Ministerio de Economía y Competitividad de España-FEDER (SAF2010-20750).

A mis padres y a mi hermano

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todas las personas, centros de investigación e instituciones financiadoras que han hecho posible la realización de esta tesis doctoral.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores de tesis, la Dra. Cristina Peña Maroto y el Dr. Félix Bonilla Velasco. Cris, gracias por enseñarme tanto en lo profesional y en lo personal, por tu cercanía y disponibilidad siempre, por confiar y darme autonomía y por haber luchado por mí y por el grupo en los últimos tiempos difíciles del laboratorio. También gracias por tu manejo vertiginoso del Excel. Félix (o Félix Antonio para Marta), gracias por haber creado un gran laboratorio donde he podido aprender tanto y conocer a grandes personas y amigos, gracias por haber sido un buen jefe, aunque se hace raro decir esto porque en realidad has sido como un segundo padre para nosotros (creo que puedo hablar en nombre de todos), y esto resume todo lo demás. Ah, y gracias al Artemisa que casi se me olvida.

También me gustaría agradecer, como no, a mis compañeros de laboratorio. Gracias Merce (solo una "miaja"), por hacerme sentir útil cuando tu PC entraba en bucle con las actualizaciones, por los buenos momentos que hemos pasado, por las confesiones y por ser "toditica" como eres. Gracias Bea G, por ser tan natural, por escucharme, reír mis chistes malos y hacerme reír con los tuyos y por ayudarme en el labo pidiendo más y más y más trabajo. Gracias Martix, mi compañera de congresos en los últimos meses, por ser tan buena y tener siempre una sonrisa. Gracias Bea Solde, por enseñarme los trucos del western, por los buenos momentos dentro y fuera del labo, como las comidas/cenas en tu casa. Javito, menos mal que había alguien de mi sexo que me entendiera, gracias por haber compartido copas y risas, y por ser un buen tipo. Gracias Vane, por tu gran carcajada hasta el atragantamiento, por ser tan maja y sencilla con las personas, los animales y los exosomas. Gracias Gemma, por ser tan positiva y sonriente. Y, por último gracias Coral, por explicar taaaaan bien cualquier mínimo detalle del detalle, por tu empatía con la gente, por aguantarme, quererme y por tener ese gran corazón.

Gracias a los laboratorios vecinos de la tercera. A los "Vallina" por ser nuestros vecinos desde tiempos ancestrales y por haber compartido material de laboratorio y muy buenos momentos. Gracias a Luis y a Laura. Gracias Irenita por tu humor parecido al mío y tu sonrisa, MartaCompte (todo junto) por tu tranquilidad y cercanía, Ángel por asistir y recordar todos los eventos y hacernos reír siempre, Rocío por aparcar en el lado correcto y ser tan natural y buena, Ana la rubia por los cafés compartidos y venir a verme cada mañana, Ana la morena por tu

tranquilidad y ser buena cuellarana, David Sánchez, Rodri, Vane, Patri... Gracias Sandra por tu agradable conversación y buen humor siempre.

Gracias a los laboratorios de inmunos: Elisa por tu simpatía y sencillez, David Ordoñez, Manuela, Antonio, Lucy por ser a veces directa pero buena siempre, Irene por beber Majú y por tu paciencia de doctora y Coral por compartir buenos cafés.

Gracias al laboratorio de linfomas y pulmón, a May por su colaboración y cercanía, a Sagra por compartir almuerzos y cafés y, en especial gracias Juliet, por ser compañera peregrina, mantenerte impasible ante los chistes y pasar a saludarme casi todos los días a mi sitio. Gracias también Irene Nieto, por tu buen humor y simpatía.

Gracias a muchas personas que han colaborado en este trabajo. En especial a los laboratorios de los Dres. Antonio García de Herreros y Alberto Muñoz por la estrecha colaboración que mantenemos desde hace muchos años. Gracias a Jesús Pinto, por las muestras de pacientes. Gracias a Alfredo Carrato y a Laura del Ramón y Cajal, por las inmunohistoquímicas realizadas. Gracias a Paloma Martín también por su colaboración con las inmunohistoquímicas. Gracias a Antonio Candia y Pilar Veguillas de Guadalajara por las muestras aportadas. Gracias a María José, Elvira, Arantxa y M^a Jesús Citores también por su colaboración en este trabajo. Gracias a Virtudes por su ayuda con los ratones.

Gracias a mis amigos de la uni (y acoplados) por serlo, por los buenos momentos vividos y los que nos quedan, por ese humor tan ofensivo a la par que inofensivo, por el Párrafo, porque sois grandes. Gracias a Fran, Mike, Alberto, Mario, Pulga, Ruby, Víctor, Pablo, Juanito, Carlos, Guille y Nacho. Gracias a Pote por ser mi compañero de piso, amigo y estar ahí siempre.

Gracias a mis amigos del Valdeluz, por estar siempre dispuestos a “tomarla”, por arreglar en tantas ocasiones el país y el fútbol, por hacer equipo cada año...fuera del campo, y por estar siempre ahí, aunque algunos estén lejos. También sois grandes. A Álex, a Juanma, a Javi, a Andrés, a Dani, a Machuca, a Josemi, a Toni, a Ame y a Pepe.

Gracias a mis amigos de Cuéllar y a los de Fuentesauco, en especial a Pablo por contar siempre conmigo, y a Miguel Ángel, los dos buenos amigos.

Gracias a mis dos familias de Cuéllar y Fuentesauco, no voy a nombrar a nadie porque sois muchos (por suerte) y todos igual de importantes. Gracias por estar siempre ahí, cercanos, y recibirme con los brazos abiertos.

Finalmente, gracias a mis padres y a mi hermano por encima de todo. Gracias a mi madre por todos los “tupers” que me das, pero sobretodo por los consejos, dedicación y atención que me prestas cada día. A mi padre, por tu paciencia, tranquilidad, talante y por estar siempre ahí dispuesto a lo que sea. Gracias a los dos por estar ahí y hacerme la vida más fácil. Gracias a mi hermano Dani, por contarme tus cosas, por tu cariño y bondad conmigo y con todo el mundo, por ser tan atento y detallista, bromista, familiar... , en definitiva porque eres un “crack”.

RESUMEN

El cáncer colorrectal es una de las neoplasias más frecuentes en los países desarrollados de Norte América y Europa. Los carcinomas, como el de colon, inician la invasión retomando la plasticidad innata que poseen tanto las células epiteliales como las células del estroma. La comunicación que se da entre estos dos tipos celulares permite la conversión de las células epiteliales a células mesenquimales mediante el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT). SNAI1 actúa como un factor iniciador del proceso de EMT en las células epiteliales, aunque varias investigaciones realizadas en los últimos años le atribuyen un papel fundamental en el mal pronóstico de los pacientes cuando la proteína es detectada en el estroma del tumor.

En la primera parte de este trabajo, proponemos a SNAI1 como un marcador de fibroblastos activos, capaz de estimular la migración y la proliferación de células de cáncer colorrectal de forma paracrina. Además, identificamos a MCP-3 como una posible citoquina mediadora de dichos efectos, que se encuentra sobre-expresada en el tejido tumoral de pacientes con cáncer colorrectal y cuya expresión está directamente asociada a los niveles de expresión de SNAI1.

En la segunda parte de este estudio, demostramos que la activación de fibroblastos con el factor de crecimiento PDGF-BB estimula el remodelado y deposición de las fibras de la matriz extracelular (MEC). Además, teniendo en cuenta la relevancia de SNAI1 cuando es expresado por fibroblastos activos y conociendo la importancia de las señales estromales y de la MEC sobre la angiogénesis del tumor; describimos cómo SNAI1, a través de la ruta de FAK, es un factor necesario para la ordenación de las fibras de la MEC. Las fibras orientadas de forma paralela son utilizadas como “carriles” por la células endoteliales, facilitándose así su activación y la formación de estructuras tubulares similares a los capilares que se forma *in vivo*. Finalmente y apoyando estos experimentos realizados *in vitro*, se demostró, en muestras de tumores de pacientes con cáncer colorrectal, la asociación directa entre la expresión estromal de SNAI1 y el marcador endotelial CD34.

SUMMARY

Colorectal cancer is one of the most common cancers in developed countries of North America and Europe. Carcinomas, such as in colon, initiate their invasion by rescuing the innate plasticity of both epithelial cells and stromal cells. The communication that occurs between both cell types allows the conversion of epithelial cells to mesenchymal cells throughout the epithelial-mesenchymal transition (EMT). SNAI1 acts as an initiator factor of the EMT process in epithelial cells. However, during last years, many research works attributed a major role in the bad prognosis of patients when the protein is detected in the tumor stroma.

In the first part of this work, we propose SNAI1 as an activated fibroblasts marker, able to stimulate colorectal cancer cells migration and proliferation in a paracrine manner. Moreover, we identify MCP-3 as a possible mediator cytokine of these effects. It is up-regulated in the tumor tissue of colorectal cancer patients and its expression is directly associated to SNAI1 expression levels.

In the second part of the study, we demonstrate that fibroblasts activation with the PDGF-BB growth factor stimulates extracellular matrix (ECM) fibers remodeling and deposition. Furthermore, taking into account the relevance of SNAI1-expressing fibroblasts and knowing the importance of the stromal signals and the MEC on the tumor angiogenesis; we describe how SNAI1, through FAK pathway, is a necessary factor for MEC fibers organization. The parallel oriented fibers are used by endothelial cells as “tracks”, facilitating their activation and the tubular structures formation similarly to *in vivo* capillaries formation. Finally, and supporting these *in vitro* experiments, it was demonstrated, in tumor samples from colorectal cancer patients, the direct association between the stromal SNAI1 expression and the endothelial marker CD34.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	29
INTRODUCCIÓN	35
1. CÁNCER.....	35
2. CÁNCER COLORRECTAL	36
3. CLÍNICA Y DIAGNÓSTICO	36
3.1. FACTORES DE RIESGO	37
3.2. PATOGÉNESIS MOLECULAR	38
3.2.1. Inestabilidad cromosómica (CIN).....	38
3.2.2. Inestabilidad de microsatélites (MSI) y metilación aberrante de islas CpG.....	40
3.3. TERAPIA DEL CÁNCER COLORRECTAL	40
3.4. MARCADORES EN CÁNCER COLORRECTAL	41
3.4.1. Marcadores de diagnóstico temprano	41
3.4.2. Marcadores predictivos y pronósticos.....	41
4. PLASTICIDAD EPITELIAL EN CÁNCER (EMT)	42
4.1. SNAI1 COMO INDUCTOR DE LA PLASTICIDAD EPITELIAL.....	43
4.1.1. SNAI1 en el desarrollo embrionario.....	43
4.1.2. SNAI1 en la EMT y la progresión tumoral	44
4.1.3. SNAI1 aumenta la recurrencia tumoral	45
5. EL MICROAMBIENTE CELULAR Y SU INFLUENCIA EN EL CÁNCER	45
5.1. LOS FIBROBLASTOS ASOCIADOS AL TUMOR.....	46
5.1.1. Una población heterogénea	46
5.1.2. Interacción con otros tipos celulares.....	46
5.1.3. Mecanismos tumorigénicos.....	47
5.2. LA MATRIZ EXTRACELULAR: NICHOS DINÁMICOS EN CÁNCER	47
5.2.1. Reservorio de factores de crecimiento.....	48
5.2.2. Nicho de células madre	48
5.2.3. Remodelado y biomecánica.....	48
5.2.4. Papel en la angiogénesis y linfangiogénesis tumoral.....	49
5.3. CÉLULAS ENDOTELIALES Y PERICITOS	51
6. COMUNICACIÓN EPITELIO-ESTROMA	51
6.1. REGULACIÓN DE SNAI1 POR SEÑALES DEL MICROAMBIENTE.....	52
6.2. SNAI1 COMO MEDIADOR DE SEÑALES PARACRINAS.....	52
6.2.1. Snai1 en la activación de fibroblastos.....	53
6.2.2. Snai1 y su papel en la matriz extracelular	54

OBJETIVOS	57
METODOLOGÍA	61
1. Cultivos celulares	61
1.1. GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES	61
1.2. MIGRACIÓN CELULAR	62
1.2.1. Ensayos de migración celular en co-cultivo	62
1.3. PROLIFERACIÓN CELULAR.....	63
1.3.1. Ensayos de proliferación celular en co-cultivo	63
1.3.2. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo (FACS)	63
2. PACIENTES Y MUESTRAS HUMANAS.....	64
2.1. ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS PRIMARIOS DE FIBROBLASTOS	65
3. SENESCENCIA CELULAR	65
4. INMUNOFLUORESCENCIA.....	65
5. INMUNOHISTOQUÍMICA	67
6. EXTRACCIÓN DE ARN DE LAS MUESTRAS Y TRANSCRIPCIÓN REVERSA.....	68
6.1. Procedimiento	68
6.2. Cuantificación de las extracciones.....	68
6.3. Transcripción Reversa.....	69
6.4. CUANTIFICACIÓN A TIEMPO REAL (Real Time PCR).....	69
7. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL	71
8. INMUNOTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT)	71
9. ARRAY DE CITOQUINAS HUMANAS	72
10. MATRICES 3-D DERIVADAS DE FIBROBLASTOS.....	73
10.1. ENSAYO DE FORMACIÓN DE TUBULOS.....	74
10.2. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN EN MATRICES 3-D DERIVADAS DE FIBROBLASTOS	75
10.3. ENSAYO DE INVASIÓN MEDIANTE CULTIVO ORGANOTÍPICO.....	75
11. XENOTRASPLANTES TUMORALES EN RATÓN	76
12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	77
RESULTADOS	81
1. EFECTOS PROTUMOROGÉNICOS DE LAS EXPRESIÓN DE SNAI1 EN FIBROBLASTOS SOBRE LAS CÉLULAS EPITELIALES DE CÁNCER DE COLON.....	81
1.1. La expresión de SNAI1 se asocia a la expresión de marcadores de fibroblastos activos	81
1.2. La migración de las células de cáncer de colon es estimulada por la señalización paracrina derivada de la expresión de SNAI1 en cultivos primarios de CAFs humanos	84

1.3.	SNAI1 aumenta la capacidad de las células para inducir la migración de células de cáncer de colon de forma paracrina	85
1.4.	SNAI1 aumenta la capacidad de las células para inducir proliferación en células de cáncer de colon de forma paracrina	87
1.5.	La expresión de SNAI1 en fibroblastos o CAFs primarios favorece la progresión del ciclo celular en células de cáncer de colon de forma paracrina	88
1.6.	SNAI1 favorece el crecimiento y la invasión tumoral en xenotransplantes de cáncer de colon en modelos <i>in vivo</i> en ratones desnudos.....	89
1.7.	Regulación del perfil de expresión de citoquinas mediado por la expresión de SNAI1 en fibroblastos.....	91
2.	LA EXPRESIÓN DE SNAI1 EN FIBROBLASTOS ACTIVOS PROMUEVE CAMBIOS EN LA MATRIZ EXTRACELULAR QUE CONTROLAN LA ANGIOGÉNESIS DEL TUMOR	95
2.1.	PDGF-BB estimula el crecimiento y la producción de matriz extracelular por los fibroblastos.....	95
2.2.	Las matrices derivadas de fibroblastos tratados con PDGF-BB estimulan la activación y tubulogénesis de las células HUVECs.....	97
2.3.	La desordenación del Colágeno I por el inhibidor de LOX bloquea la tubulogénesis de células endoteliales	99
2.4.	El alineamiento de los fibroblastos, el remodelado de la matriz y la formación de túbulos son dependientes de la ruta FAK.....	103
2.5.	SNAI1 es necesario para el alineamiento de los fibroblastos, el remodelado de la matriz extracelular y la formación de túbulos inducidos por PDGF-BB.....	107
2.6.	Fibroblastos expresando SNAI1 inducen la invasión y proliferación de las células HUVECs.....	114
2.7.	El modelado de la MEC en CAFs es dependiente de la expresión en fibroblastos del eje PDGFR- β /SNAI1	117
2.8.	La expresión de SNAI1 en el estroma tumoral de pacientes con CCR se asocia a MAYORES NIVELES DE angiogénesis.....	121
	DISCUSION	125
1.	EFFECTOS PROTUMOROGÉNICOS DE LAS EXPRESIÓN DE SNAI1 EN FIBROBLASTOS SOBRE LAS CÉLULAS EPITELIALES DE CÁNCER DE COLON.....	125
1.1.	SNAI1 COMO MARCADOR DE FIBROBLASTO ACTIVADO	125
1.2.	EFFECTO PARACRINO DE LA EXPRESIÓN DE SNAI1 EN FIBROBLASTOS	126
1.3.	MCP-3 COMO MEDIADOR DEL EFFECTO PRO-TUMOROGÉNICO	127
1.4.	CONSIDERACIONES FINALES	128

2. LA ACTIVACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES EN LA MATRIZ EXTRACELULAR ESTÁ	
MEDIADO POR EL EJE PDGF-BB/SNAI1 EN FIBROBLASTOS	128
2.1. DINÁMICA DE LA MEC MEDIADA POR PDGF-BB.....	129
2.2. PAPEL DE UNA MEC ORDENADA EN EL PROCESO ANGIOGÉNICO	130
2.3. PAPEL DEL EJE PDGF-BB/FAK/SNAI1 EN LA ACTIVACIÓN ENDOTELIAL MEDIADA POR LA MEC	131
2.4. CONSIDERACIONES FINALES	133
3. POTENCIAL DE APLICABILIDAD	134
CONCLUSIONES	139
BIBLIOGRAFÍA	143
ANEXOS.....	164

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Capacidades adquiridas por las células malignas necesarias para el crecimiento y la progresión tumoral	35
Figura 2. Progresión del cáncer colorrectal y acumulación de alteraciones genéticas.....	38
Figura 3. Estructura de SNAI1. SNAI1 contiene un dominio SNAG en el extremo N-terminal y dominios de tipo “dedo de zinc” en el C-terminal	43
Figura 4. Una MEC anormal favorece la progresión del cáncer	49
Figura 5. Papel de la MEC en la angiogénesis y la formación de vasos linfáticos	50
Figura 6. Representación esquemática de la progresión del ensayo de tubulogénesis realizado sobre matrices 3D derivadas de fibroblastos.	75
Figura 7. Representación esquemática de la progresión del ensayo de invasión de células HUVECs en co-cultivo con MEFs (cultivo organotípico).	76
Figura 8. Establecimiento y caracterización de cultivos primarios de CAFs de pacientes con CC.....	82
Figura 9. La expresión de SNAI1 se asocia con la expresión de marcadores de fibroblastos activos	83
Figura 10. La expresión de SNAI1, FAP y α -SMA muestra un patrón de expresión similar en muestras de pacientes con cáncer de colon	83
Figura 11. La migración de las células de cáncer de colon es estimulada por la señalización paracrina derivada de la expresión de SNAI1 en CAFs primarios humanos	85
Figura 12. SNAI1 aumenta la capacidad de las células para inducir la migración de células de cáncer de colon de forma paracrina	86
Figura 13. SNAI1 aumenta la capacidad de las células para inducir la proliferación de células de cáncer de colon de forma paracrina	88
Figura 14. La expresión de SNAI1 en fibroblastos o CAFs favorece la progresión del ciclo celular en células con cáncer de colon de forma paracrina	89
Figura 15. La expresión de Snai1 en los fibroblastos es necesaria para el efecto co-adyuvante de estas células sobre la proliferación de las células tumorales en xenotransplantes de cáncer de colon en ratones desnudos	90

Figura 16. La expresión de Snai1 en fibroblastos es necesaria para el efecto co-adyuvante de estas células sobre la invasión de las células tumorales en xenotransplantes de cáncer de colon en ratones desnudos.....	91
Figura 17. Las proteínas recombinantes Fractalquina y MCP-3 inducen la migración de células de cáncer de colon de forma estadísticamente significativa	93
Figura 18. Los niveles de expresión del gen MCP-3 se asocian de forma positiva con los niveles de expresión de SNAI1	94
Figura 19. PDGF-BB estimula la organización de los fibroblastos BJ-hTERT y su crecimiento en multicapa	95
Figura 20. PDGF-BB estimula en fibroblastos BJ-hTERT la deposición de matriz extracelular.....	96
Figura 21. PDGF-BB estimula el modelado de la MEC generada por fibroblastos BJ-hTERT.....	97
Figura 22. Las células HUVECs no presentan expresión de PDGFR- β	98
Figura 23. Las matrices derivadas de fibroblastos tratados con PDGF-BB estimulan la activación y tubulogénesis de las células HUVECs	99
Figura 24. PDGF-BB estimula la organización de los fibroblastos BJ-hTERT y su crecimiento en multicapa	100
Figura 25. El inhibidor de LOX (BAPN) reduce la deposición y orientación de las fibras de Colágeno I.....	102
Figura 26. El tratamiento de fibroblastos BJ-hTERT con concentraciones crecientes de BAPN no inhibió la expresión de la proteína LOX.....	103
Figura 27. Las matrices derivadas de fibroblastos tratados con BAPN bloquean la tubulogénesis de las células HUVECs.....	103
Figura 28. Puesta a punto de las concentraciones de los inhibidores de las rutas de ERK1/2, PI3K/Akt y FAK en fibroblastos BJ-hTERT	104
Figura 29. El alineamiento de los fibroblastos inducido por PDGF-BB es dependiente de la ruta FAK.....	105
Figura 30. La deposición y orientación de las fibras de la MEC son propiedades dependientes de las rutas PI3K/Akt y FAK.....	106
Figura 31. Las matrices derivadas de fibroblastos tratados con PF573228 bloquean la tubulogénesis de las células HUVECs.....	107

Figura 32. La expresión de SNAI1 y su internalización al núcleo aumentan con el tratamiento de PDGF-BB	108
Figura 33. La expresión de SNAI1 y su internalización al núcleo son dependientes de la ruta de FAK.....	110
Figura 34. El alineamiento de los fibroblastos inducido por PDGF-BB es dependiente de la expresión de SNAI1	111
Figura 35. La deposición y orientación de las fibras de la MEC son propiedades dependientes de la expresión de SNAI1	113
Figura 36. Las matrices derivadas de fibroblastos tratados con PDGF-BB estimulan la activación y tubulogénesis de las células HUVECs	114
Figura 37. Matrices 3D de fibroblastos con expresión de SNAI1 inducen la proliferación de las células HUVECs.....	115
Figura 38. La invasión de células HUVECs es estimulada en co-cultivo organotípico con fibroblastos MEFs Snai1 (+/+) tratados con PDGF-BB y embebidos en geles de Colágeno I.....	116
Figura 39. La organización celular y la ordenación de las fibras de Colágeno I y FN1 es mayor en los CAFs que en los NFs aislados del mismo paciente	118
Figura 40. El modelado de la MEC en CAFs es dependiente de la expresión en fibroblastos del eje PDGFR- β /SNAI1	119
Figura 41. El modelado de la MEC en CAFs es dependiente de la expresión en fibroblastos del eje PDGFR- β /SNAI1	120
Figura 42. La expresión de SNAI1 en el estroma tumoral de pacientes con CCR se asocia a mayores niveles de angiogénesis.....	121

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Líneas celulares utilizadas en los diferentes ensayos funcionales desarrollados en el estudio.....	61
Tabla II. Líneas celulares utilizadas en los diferentes ensayos de migración desarrollados en el estudio	62
Tabla III. Secuencias de los cebadores utilizados y condiciones para la amplificación de los genes de referencia	70
Tabla IV. Secuencias de los cebadores utilizados y condiciones para la amplificación de los marcadores estromales y de proteínas de la matriz extracelular analizados	70
Tabla V. Anticuerpos usados para la inmunodetección y cuantificación por inmunotransferencia de proteínas específicas	72
Tabla VI. Proteínas desreguladas en el medio condicionado de fibroblastos 1.BR3.G transfectados con Snai1 respecto a los fibroblastos control	92

ABREVIATURAS

5-FU	5-fluoracilo
Akt	Del inglés <i>V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog</i>
ANG-1	Angiopoyetina-1
APC	Del inglés <i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
ATCC	Del inglés, <i>American Type Cell Culture Collection</i>
BAPN	Beta-Aminopropionitrilo
bFGF	Del inglés <i>Fibroblast Growth Factor 2 (Basic)</i>
BRAF	Del inglés inglés <i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
CAFs	Del inglés <i>Cancer Associated Fibroblasts</i>
CCR	Cáncer colorrectal
CDH1	Del inglés <i>Cadherin 1, Type 1</i>
CDH5	Del inglés <i>Cadherin 5, Type 2 (Vascular Endothelium)</i>
CEA	Antígeno Carcinoembrionario
CIMP	Del inglés <i>CpG island methylator phenotype</i>
CIN	Del inglés <i>Chromosomal Instability</i>
COX	Citocromo C Oxidasa
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CSCs	Del inglés <i>Cancer Stem Cells</i>
CXCL	Del inglés <i>Chemokine (C-X-C Motif) Ligand</i>
CXCL8	Del inglés <i>Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 8</i>
DDR2	Del inglés <i>Discoidin Domain Receptor Tyrosine Kinase 2</i>
DLL4	Del inglés <i>Delta-Like 4 (Drosophila)</i>
DMEM-C	DMEM Completo
EBM-2	Del inglés, <i>Endothelial Basic Medium-2</i>
EGM-2	Del inglés, <i>Endothelial Cell Growth Medium-2</i>
EGR-1	Del inglés <i>Early Growth Response 1</i>
EMT	Del inglés <i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i>
FAK	Del inglés <i>Focal Adhesion Kinase</i>
FAP	Del Inglés <i>Fibroblast Activation Protein</i>
FBM	Del inglés, <i>Fibroblast Basal Medium</i>
FGM-2	Del inglés, <i>Fibroblast Growth Medium</i>
FN1	Fibronectina 1
FSP1	Del Inglés <i>Fibroblast-Specific Protein 1</i>

GSK3 β	Del inglés <i>Glycogen Synthase Kinase 3 Beta</i>
HA	Hialuronano
HUVECs	Del inglés <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
IHC	Inmunohistoquímica
IL	Del inglés <i>Interleukin</i>
IRS2	Del inglés <i>Insulin Receptor Substrate 2</i>
KRAS	Del inglés <i>Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
LOX	Del inglés <i>Lysyl Oxidase</i>
LOXL2	Del inglés <i>Lysyl Oxidase-Like 2</i>
MAPK	Del inglés <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MCP-1	Del inglés <i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MEC	Matriz Extracelular
MEFs	Del inglés <i>Mouse Embryonic Fibroblasts</i>
MET	Del inglés <i>Mesenchymal-Epithelial Transition</i>
MLH	Del inglés <i>MutL Homolog</i>
MMP	Del inglés <i>Matrix Metallopeptidase</i>
MMR	Del inglés <i>Missmatch-Repair</i>
MSH	Del inglés <i>MutS Homolog</i>
MSI	Del Inglés <i>Microsatellite Instability</i>
NES	Del inglés <i>Nuclear Export Signal</i>
NFs	Del inglés, <i>Normal Fibroblasts</i>
NF- $\kappa\beta$	Del inglés <i>Nuclear Factor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells</i>
NR2F6	Del inglés <i>Nuclear Receptor Subfamily 2, Group F, Member 6</i>
PAK4	Del inglés <i>P21 Protein (Cdc42/Rac)-Activated Kinase 4</i>
PanCK	Pancitoqueratina
PDGF	Del inglés <i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDGFR- β	Del inglés <i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor-β</i>
PFA	Paraformaldehído
PGE2	Prostaglandina E2
PI3K	Del inglés, <i>Phosphatidylinositol 3-Kinase</i>
PMS2	Del inglés <i>PMS1 Homolog 2, Mismatch Repair System Component</i>
PTEN	Del inglés <i>Phosphatase Y Tensin Homolog</i>
RhoA	Del inglés <i>Ras Homolog Family Member A</i>
RTKs	Receptores Tirosín Quinasa

SDHA	Del inglés Succinate Dehydrogenase Complex, Subunit A
SEOM	Sociedad Española de Oncología Médica
SMAD4	Del inglés <i>Mothers Against DPP Homolog 4</i>
SNAI1	snail de humano
Snai1	snail de ratón
SRD	Dominio Rico en Serinas
STAT3	Del inglés <i>Signal Transducer And Activator Of Transcription 3</i>
TBP	Del inglés <i>TATA Binding Protein</i>
TNF α	Del inglés <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
TNM	Tamaño tumoral, número de ganglios afectados y presencia o no de metástasis
TP53	Del inglés <i>Tumor Protein P53</i>
UBC	Ubiquitina C
VCAM1	Del inglés <i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>
VDR	Receptor de Vitamina D
VEGF	Del Inglés <i>Vascular Endotelial Growth Factor</i>
WHO	Del inglés World Health Organization
ZEB	Del inglés <i>Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1</i>
α -SMA	Del Inglés <i>α-Smooth Muscle Actin</i>



INTRODUCCION

INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER

Cáncer es un término genérico que recoge un conjunto de enfermedades, de carácter genético y heterogéneo, que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo humano. En condiciones normales, las células se dividen, crecen, envejecen y mueren, para ser reemplazadas por células nuevas que mantienen la homeostasis del individuo. Sin embargo, en el cáncer este proceso se descontrola, y las células anormales comienza a dividirse sin interrupción llegando a formar masas celulares denominadas tumores, que pueden dañar tejidos y órganos.

Una célula normal se transforma en tumoral por la acumulación secuencial de alteraciones genéticas y epigenéticas que confieren a la célula ciertas ventajas selectivas, fundamentales en el crecimiento y progresión tumoral, como son: proliferación y replicación ilimitada, inestabilidad genómica, crecimiento independiente de las señales supresoras del crecimiento y producción de señales inflamatorias, resistencia a las señales apoptóticas, desarrollo de nuevos vasos a partir del lecho vascular preexistente (angiogénesis), reprogramación del metabolismo energético y evasión del sistema inmune (Hanahan y Weinberg, 2011) (**Figura 1**).



Figura 1. Capacidades adquiridas por las células malignas necesarias para el crecimiento y la progresión tumoral (Modificado de Hanahan y Weinberg, 2011).

En los tumores de tipo maligno, la adquisición de estas características junto con la presión selectiva del tumor, hace que las células invadan el microambiente local, se intravasen en la vasculatura sanguínea y linfática para, finalmente, diseminarse y extravasarse en otros tejidos y órganos. La última fase, denominada colonización, depende de la capacidad de adaptación de las células diseminadas al microambiente del nuevo tejido, donde sufrirán un nuevo proceso de selección para dar lugar a nuevas masas tumorales, llamadas metástasis (Scheel et al., 2007).

Las alteraciones genéticas pueden producirse espontáneamente como resultado de las limitaciones existentes en los mecanismos de replicación y reparación del ADN, heredarse de los progenitores y/o ser causadas por factores carcinogénicos endógenos (hormonales, inflamatorios, autoinmunes y productos del metabolismo celular) y/o exógenos (tabaco, alcohol, contaminantes de los alimentos, radiaciones, contaminación ambiental, exposiciones ocupacionales o infecciones causadas por determinados virus). El envejecimiento es otro factor fundamental en la aparición del cáncer, cuya incidencia aumenta con la edad, probablemente debido a la acumulación de alteraciones en el ADN por la exposición continuada a factores de riesgo y por la tendencia que tienen los mecanismos de reparación celular de perder eficacia con la edad (Stewart y Wild, 2014).

2. CÁNCER COLORRECTAL

El cáncer colorrectal (CCR) se define como un carcinoma o cáncer de células epiteliales que se localiza en el colon o en el recto. El CCR representa el 9,4% de los casos de cáncer a nivel mundial, siendo el cáncer con mayor incidencia en España si se tienen en cuenta ambos sexos (15%). Según datos de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), se calcula una incidencia de 32.240 pacientes al año en España, siendo responsable de 14.700 fallecimientos y una prevalencia a cinco años de 89.705 casos (<http://www.seom.org>). La supervivencia de estos pacientes estimada a los 5 años depende fundamentalmente del estadio tumoral, siendo de 95-100%, 70-85%, 50-70% y 5-15% en los pacientes con CCR en estadio I, II, III y IV, respectivamente, de acuerdo con la clasificación TNM (tamaño tumoral, número de ganglios afectados y presencia o no de metástasis). En la última década, la tasa de mortalidad muestra un descenso significativo debido al avance en el conocimiento de los mecanismos que participan en el desarrollo y la progresión del CCR, a la identificación de factores genéticos implicados en la caracterización de la historia natural de esta neoplasia, al establecimiento de estrategias preventivas, al desarrollo de técnicas diagnósticas y a la introducción de nuevas estrategias terapéuticas.

3. CLÍNICA Y DIAGNÓSTICO

La forma de presentación del CCR es muy variable, dependiendo de su localización a nivel de los distintos segmentos del colon y de las características de la propia lesión. Durante largos periodos de tiempo es silente, produciendo síntomas, en la mayoría de los casos, cuando el tumor está muy avanzado, por ellos la analítica rutinaria en muchos casos es completamente normal. Se puede detectar la existencia de anemia y ferropenia (Annibale et al., 2001). El origen digestivo se sospecha si se encuentra sangre oculta en heces. Los test de función hepática se encuentran

alterados cuando existen metástasis hepáticas. Varios marcadores tumorales séricos se han asociado con cáncer colorrectal, sobre todo CEA (antígeno carcinoembrionario). Así, el rendimiento diagnóstico por datos moleculares es bajo debido a que puede encontrarse elevado en otras enfermedades benignas y a su baja sensibilidad en el estadio inicial de la enfermedad (Duffy et al., 2003).

Sin embargo, sí se puede llegar a un diagnóstico de certeza mediante una combinación de datos clínicos y analíticos, así como la utilización de técnicas de imagen y de abordaje directo, que además, nos permite la toma de muestras para estudios histológicos. Las técnicas de las que se disponen y se manejan actualmente son:

- Sangre oculta en heces. Se utiliza sobre todo como método de despistaje en la población (Mandel et al., 2000).
- Enema de bario con doble contraste. Es un método diagnóstico poco utilizado actualmente (Rex, 2002).
- Colonoscopia. Nos permite valorar toda la mucosa colónica y la toma de biopsias (Rembacken et al., 2000).
- Colonoscopia virtual. Permite obtener imágenes tomográficas, y su posterior reconstrucción por ordenador en dos o tres dimensiones (Pickhardt et al., 2003).
- Ecoendoscopia. Se utiliza para evaluar la invasión del cáncer rectal (Norton y Thomas, 1999).

3.1. FACTORES DE RIESGO

La etiología del CCR se desconoce, aunque se piensa que es multifactorial debido a una interacción entre predisposición genética y factores ambientales como hábitos dietéticos y estilo de vida, explicándose así la alta frecuencia en los países desarrollados (Troisi et al., 1999). Por tanto, a parte de la edad y el sexo masculino, estudios epidemiológicos han identificado y establecido los siguientes factores de riesgo:

- Factores médicos: historia familiar previa de cáncer colorrectal (Taylor et al., 2010), enfermedad inflamatoria intestinal (Jess et al., 2012), diabetes (Jiang et al., 2011), infección por *Helicobacter pylori* (Sonnenberg y Genta, 2012) y otras infecciones.
- Factores derivados del estilo de vida y la dieta: el tabaco (Liang et al., 2009), el alcohol (Fedirko et al., 2011), el elevado consumo de carne roja y procesada (Chan et al., 2011), y la obesidad (Ma et al., 2013).

Sin embargo, también se han establecido los factores que previenen el CCR, entre los que se incluyen: la actividad física, la terapia de reemplazo hormonal, la aspirina, la eliminación de lesiones precancerosas por endoscopia y la dieta (rica en frutas, verduras, cereales integrales, el calcio y la vitamina D) (Brenner et al., 2014).

3.2. PATOGÉNESIS MOLECULAR

El CCR se desarrolla siguiendo una serie ordenada de pasos que comienzan con la transformación del epitelio normal del colon a un pólipo benigno adenomatoso, que evoluciona a adenoma avanzado y, finalmente, a adenocarcinoma (**Figura 2**). Este proceso se ha denominado “secuencia adenoma-carcinoma” (Morson, 1974).

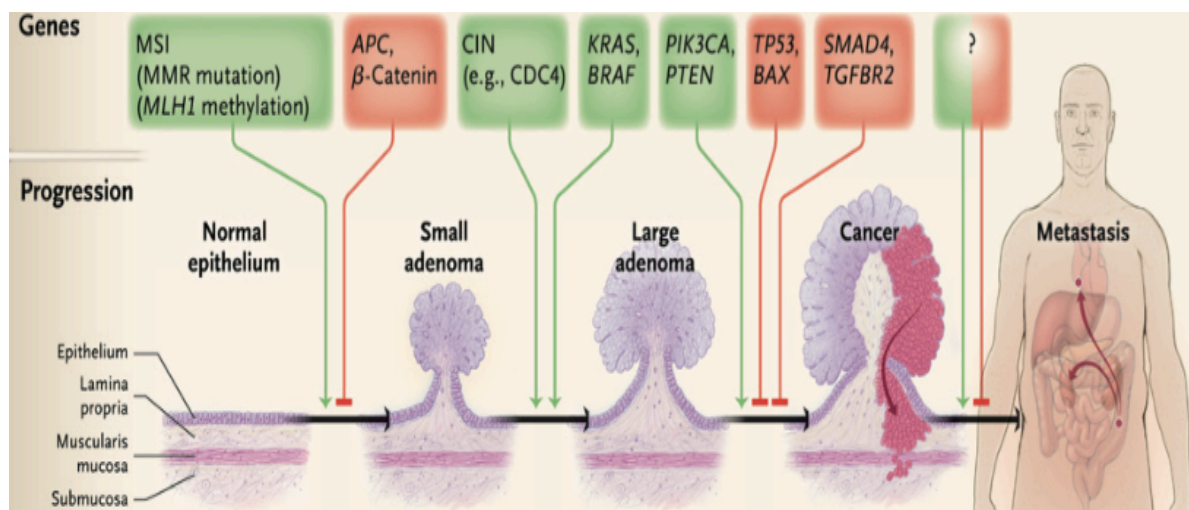


Figura 2. Progresión del cáncer colorrectal y acumulación de alteraciones genéticas (Modificado de Markowitz y Bertagnolli; 2009).

Para la progresión hacia carcinoma se necesitan varios eventos genéticos en los que la inestabilidad genómica está reconocida como la principal causa de las mutaciones que se producen en las células. La acumulación de alteraciones se puede producir principalmente por dos vías: la inestabilidad cromosómica (CIN, del Inglés *Chromosomal Instability*), que sucede en el 85% de los CCR, y la inestabilidad en microsatélites (MSI, del Inglés *Microsatellite Instability*) en el 15% restante y que solapa con la metilación de islas CpG (Lengauer et al., 1998; Lindblom, 2001).

3.2.1. Inestabilidad cromosómica (CIN)

Es el tipo más común de inestabilidad genómica e implica cambios en el número de copias cromosómicas (aneuploidías) y en su estructura, incluyendo ganancias y pérdidas alélicas, así como translocaciones (Lengauer et al., 1997).

Esta categoría de CCR se caracteriza por mutaciones que activan la ruta de señalización Wnt (Fearon, 2011), un evento iniciador del CCR. Las mutaciones más comunes dan lugar a inactivación del gen *APC* (del inglés *Adenomatous Polyposis Coli*), dándose el paso de β -catenina al núcleo y activándose la ruta Wnt de forma constitutiva (Goss y Groden, 2000; Vogelstein y Kinzler, 2002; Fearon y Bommer, 2008). Mutaciones de *APC* en la línea germinal dan lugar a la adenomatosis polipósica familiar, mientras que mutaciones en la línea somática están presentes en la mayoría de CCR esporádico (Goss y Groden, 2000; Vogelstein y Kinzler, 2002; Lynch et al., 2008). En un pequeño grupo se dan también mutaciones de β -catenina que impiden su degradación y llevan también a la activación de la ruta (Korinek et al., 1997; Morin et al., 1997; Goss y Groden, 2000; Vogelstein y Kinzler, 2002).

Mutaciones en *RAS*, principalmente en *KRAS*, así como en el gen *BRAF*, activan la cascada de señalización de las MAPK. Mutaciones en ambos genes se dan en fases tempranas de la tumorigénesis en CCR, en la progresión a adenoma intermedio, detectándose incluso en pequeños pólipos (Rajagopalan et al., 2002; Nosho et al., 2008) (Nosho et al., 2008; Rajagopalan et al., 2002).

El tercer evento genético es la inactivación de la ruta de señalización supresora de tumores de TGF- β , que coincide con la transición de adenoma a displasia de alto grado o a carcinoma (Grady y Markowitz, 2008). El resultado es la inactivación de la ruta de TGF- β o de las proteínas que actúan en niveles inferiores de la ruta, como SMAD4, que puede ocurrir por defectos en la reparación del desapareamiento de bases o MMR (del inglés *Mismatch-Repair*); o bien mutaciones de pérdida de función o deleciones (Markowitz y Bertagnolli, 2009).

El siguiente paso genético en el CCR es la inactivación del gen *TP53*, implicado en la parada del ciclo celular (Vazquez et al., 2008). En la mayor parte de los tumores los dos alelos del gen se encuentran mutados, evento que coincide con la transición de adenoma a carcinoma (Vogelstein y Kinzler, 2002; Fearon y Bommer, 2008).

Una tercera parte de los CCR ocurren por activación somática de la ruta de PI3K (del inglés, *Phosphatidylinositol 3-Kinase*) (Samuels et al., 2004). Otras mutaciones menos frecuentes incluyen pérdida del inhibidor de PI3K, PTEN, o amplificaciones de proteínas en niveles inferiores de estas rutas, como IRS2, AKT y PAK4 (Parsons et al., 2005).

3.2.2. Inestabilidad de microsatélites (MSI) y metilación aberrante de islas CpG

En un subgrupo de pacientes con CCR esporádico ocurre una inactivación de genes MMR en zonas del ADN con secuencias repetitivas que se denominan microsatélites. La inactivación de estos genes puede venir dada por metilación del promotor del gen *MLH1* o por mutaciones somáticas en *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* o *PMS2*. Mutaciones germinales en alguno de estos genes dan lugar al síndrome de Lynch, un tipo de CCR hereditario no polipósico (Boland y Goel, 2010; Gala y Chung, 2011).

Por otra parte, en el ADN existen ciertas zonas repetitivas ricas en CpG, denominadas islas CpG, caracterizadas por la presencia de citosinas metiladas que impiden la unión de la maquinaria de transcripción induciendo silenciamiento de genes supresores de tumores, como ocurre con el gen *MLH1*. Además, el grado de metilación aberrante de los promotores determina fenotipos con riesgo de CCR, denominados fenotipo CIMP (del inglés *CpG island methylator phenotype*) o CIMP-alto y CIMP-bajo, en función del grado de metilación (Markowitz y Bertagnolli, 2009).

3.3. TERAPIA DEL CÁNCER COLORRECTAL

Los pilares terapéuticos actuales de los pacientes con CCR siguen siendo la cirugía y/o la quimioterapia clásica. La quimioterapia tradicional es el tratamiento de las enfermedades neoplásicas con drogas que destruyen las células tumorales deteniendo su capacidad de división activa, así como otros tipos celulares normales con alta capacidad proliferativa. En etapas avanzadas, se pueden aplicar terapias dirigidas que engloban a fármacos que interfieren con moléculas específicas implicadas en el crecimiento de las células tumorales.

El tratamiento estándar para los pacientes con cáncer de colon en la fase de enfermedad localizada es la cirugía mediante escisión local (polipectomía) o resección de la zona afectada (colectomía), así como la extirpación de los ganglios linfáticos primarios y regionales. El valor potencial de la quimioterapia adyuvante para los pacientes de cáncer de colon en estadio II sigue siendo polémico. La decisión de utilizar quimioterapia adyuvante en estos pacientes es complicada y exige que tanto el paciente como el médico lo ponderen. En el caso de pacientes con CCR en estadio III, las opciones de tratamiento estándar son cirugía seguida de quimioterapia adyuvante, donde el análogo de la pirimidina 5-fluorouracilo (5-FU) fue el tratamiento de referencia hasta el año 2000. Actualmente, los regímenes de quimioterapia más usados para estos casos son el régimen FOLFOX (oxaliplatino, leucovorina y 5-FU) y el régimenXELOX (capecitabina y oxaliplatino). El tratamiento de los pacientes de cáncer de colon avanzado o recidivante depende de la ubicación de la enfermedad. Se aplica la resección quirúrgica si es posible, seguida de quimioterapia y terapia

dirigida. En la actualidad, los mismos fármacos activos usados en el tratamiento adyuvante, están aprobados para pacientes con cáncer colorrectal metastásico, bien en monoterapia o en combinación con otros medicamentos.

3.4. MARCADORES EN CÁNCER COLORRECTAL

3.4.1. Marcadores de diagnóstico temprano

El desarrollo de marcadores moleculares para el diagnóstico temprano del CCR de forma no invasiva, constituye una importante herramienta traslacional en la práctica clínica. Desde la década de 1960, se han desarrollado varios tests para la detección de la sangre oculta en heces, con una especificidad modesta en CCR (Greegor, 1967). Esta limitación llevó al desarrollo de tests que detectan la hemoglobina en sangre mediante un inmunoensayo (Ahlquist et al., 2000). Dadas las limitaciones de los métodos anteriores para la detección del CCR, los esfuerzos se han centrado en el desarrollo de nuevos tests basados en las alteraciones moleculares observadas en pólipos y CCR en muestras de heces de pacientes. La observación directa de muestras histológicas ha demostrado que los CCRs y pólipos presentan una mayor exfoliación de células neoplásicas al lumen del colon, en comparación con la mucosa normal, lo que ha llevado al desarrollo de varios tests para la detección del ADN de los componentes celulares exfoliados (Ahlquist et al., 2000; Christofori, 2003). Por último, una línea paralela de investigaciones se ha centrado en el desarrollo de marcadores en plasma sanguíneo, donde se ha testado de nuevo la metilación del ADN (Dickinson et al., 2015).

3.4.2. Marcadores predictivos y pronósticos

Un ejemplo clásico de marcador molecular predictivo que ha quedado introducido en la práctica clínica de forma rutinaria es el análisis de *KRAS* en pacientes con CCR metastásico. Mutaciones somáticas en el oncogén *KRAS* (Karapetis et al., 2008) o la mutación V600E (Di Nicolantonio et al., 2008) en *BRAF*, inducen resistencia celular al tratamiento con el anticuerpo anti-EGFR.

Además de su utilidad en la identificación de familias con CCR hereditario, el análisis de la MSI aporta información de valor en el pronóstico y la respuesta a la terapia de los pacientes. Pacientes con MSI-alto tienen mejor pronóstico y no se van a beneficiar de la terapia adyuvante con fluoracilo, sin embargo, sí presentarían una mejor respuesta al tratamiento con irinotecan. En contra, el subtipo MSI-bajo muestran un fenotipo CIMP con estabilidad de microsatélites y tienen peor pronóstico (Ribic et al., 2003; Markowitz y Bertagnolli, 2009).

Existen además, marcadores genómicos de gran utilidad para el pronóstico. Por ejemplo, mutaciones germinales en genes supresores como *APC*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, indican alto riesgo de CCR y marcan la supervivencia de los pacientes y la recomendación de cirugía profiláctica (Samowitz et al., 2001; Kim et al., 2007). Entre los marcadores somáticos con valor pronóstico se encuentra la inactivación por metilación de *MLH1*, asociado a mejor pronóstico, o la pérdida de heterocigosidad del brazo largo del cromosoma 18 (18q), indicador de peor pronóstico (Watanabe et al., 2001).

4. PLASTICIDAD EPITELIAL EN CÁNCER (EMT)

La mayor parte de los tejidos adultos y órganos surgen como consecuencia de una serie de transformaciones de las células epiteliales a células mesenquimales, por medio de la transición epitelio-mesénquima o EMT (del inglés, *Epithelial-Mesenchymal Transition*) (Barrallo-Gimeno y Nieto, 2005). La EMT es un proceso presente en el desarrollo embrionario y en la progresión tumoral, en el cual las células epiteliales, que inicialmente se encuentran estáticas, pierden su polaridad apicobasal y adquieren características mesenquimales que les permiten migrar como entidades aisladas o en grupo, resistir a la apoptosis y aumentar la producción de proteínas de la Matriz Extracelular (MEC) (Hay, 1995; Thiery et al., 2009). Al tratarse de un proceso reversible, las células pueden sufrir un proceso de diferenciación y dar lugar de nuevo a estructuras epiteliales, en lo que se denomina transición mesénquima-epitelio o MET (del inglés, *Mesenchymal-Epithelial Transition*).

Como ya se ha mencionado antes, la metástasis es un proceso complejo dividido en una serie de etapas que comprenden: el desprendimiento de la célula tumoral del tumor primario, la invasión, la intravasación, la supervivencia en la circulación tumoral, la extravasación y la colonización del nuevo nicho. La EMT está implicada en distintas etapas de la metástasis de muchos tumores sólidos. Una de las características moleculares de la EMT es la pérdida funcional de la expresión de E-cadherina (*CDH1*), una proteína implicada en el mantenimiento de la polaridad y el fenotipo epitelial (Hanahan y Weinberg, 2011). Por tanto, al igual que ocurre en la embriogénesis, la EMT se ha propuesto como un mecanismo de reactivación de las células tumorales asociado a una mayor invasión y dediferenciación de las mismas, que podría explicar de forma simplista el inicio de la metástasis. Sin embargo, el proceso de la EMT todavía se sigue cuestionando ya que, hasta la fecha, no se han encontrado evidencias patológicas de su presencia en pacientes, si bien existe una cantidad significativa de datos en líneas celulares y xenoinjertos que apoyan su existencia *in vivo*.

Los cambios fenotípicos que se dan durante el proceso de EMT implican una reprogramación a nivel molecular en la que participan varios factores de transcripción en respuesta

a estímulos del microambiente, entre los que se incluyen: la familia Snail/Slug, Twist, ZEB1, ZEB2 y E12/E47 (Wang et al., 2013).

4.1. SNAI1 COMO INDUCTOR DE LA PLASTICIDAD EPITELIAL

La familia de proteínas de Snail comprende tres proteínas identificadas en vertebrados: SNAI1 (Snail), SNAI2 (Slug) y SNAI3 (Smuc). Los tres miembros de la familia codifican para represores transcripcionales que comparten una estructura similar con un dominio SNAG en la región N-terminal y dominio de tipo “dedo de zinc” de unión al ADN en el extremo C-terminal. El dominio SNAG es necesario para interaccionar con los complejos co-represores. También es responsable de la actividad represora de SNAI1 el extremo C-terminal con los dominios “dedo de zinc”, que se unen a secuencias consenso de tipo “E-box” (CAGGTG) en promotores génicos como el de *CDH1* (E-cadherina) (Wang et al., 2013) (**Figura 3**).

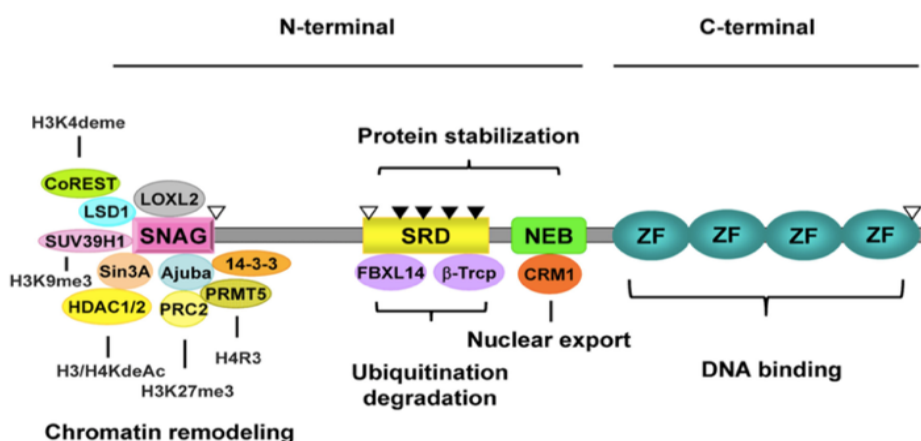


Figura 3. Estructura de SNAI1. SNAI1 contiene un dominio SNAG en el extremo N-terminal y dominios de tipo “dedo de zinc” en el C-terminal. El dominio SNAG interacciona con varios complejos co-represores y epigenéticos, y el C-terminal es responsable de la unión al ADN. La región central, con el dominio SRD y la secuencia NES, es responsable de la estabilidad de la proteína y la localización subcelular (Wang et al. 2013).

4.1.1. SNAI1 en el desarrollo embrionario

El primer miembro de la familia de Snail, SNAI1, fue descrito por primera vez en *Drosophila melanogaster*, donde es esencial para la invaginación del mesodermo y la formación de la cresta neural (Alberga et al., 1991; Hemavathy et al., 2004). En mamíferos, ratones con SNAI1 deletado son incapaces de formar el mesodermo y mueren en la gastrulación (Murray et al., 2007). Además, SNAI1 juega un papel muy importante en la inhibición del proceso de diferenciación, un paso crítico en el desarrollo de los tejidos (Batlle et al., 2013).

4.1.2. SNAI1 en la EMT y la progresión tumoral

El primer estadio del CCR es el adenoma, un tipo de lesión precancerosa que suele progresar a adenocarcinoma y, finalmente, a carcinoma invasivo y metástasis. En dichas estructuras precancerosas del CCR ya se ha descrito la expresión de SNAI1 (Kroepil et al., 2012). SNAI1 actúa como un inductor clásico del proceso de EMT mediante la represión directa del promotor de *CDH1*, gen esencial para el mantenimiento del fenotipo epitelial (Barrallo-Gimeno y Nieto, 2005). Así, en las células tumorales es frecuente la represión de *CDH1* y la inducción de la EMT por SNAI1 (Kalluri y Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009). En la mayor parte de los casos, la expresión de SNAI1 correlaciona inversamente con la expresión de *CDH1* (Blanco et al., 2002; Peña et al., 2005, 2009; Batlle et al., 2013). Como reguladores críticos de múltiples eventos de señalización que llevan a la EMT y a la pérdida de adhesión, tanto la sobreexpresión de *SNAI1* como la disminución en los niveles de E-cadherina se han detectado en varios tipos de carcinomas (Cano et al., 2000; Blanco et al., 2002; Elloul et al., 2005; Kuphal et al., 2005; Martin et al., 2005; Vandewalle et al., 2005; Alves et al., 2007; DiMeo et al., 2009; Francí et al., 2009; Emadi Baygi et al., 2010) asociados con estadios avanzados del tumor y la metástasis, junto con peores tiempos de supervivencia en los pacientes (Kalluri et al., 2009; Peña et al., 2005; Thiery et al., 2009). En conjunto, estos datos sugieren la participación de SNAI1 tanto en las etapas iniciales del CCR como en la diseminación metastásica por parte de las células tumorales. Dado que, además, se ha descrito que la inhibición del factor de transcripción impide el crecimiento tumoral y la metástasis (Kudo-Saito et al., 2009), SNAI1 puede considerarse una diana efectiva para la prevención de las metástasis.

Molecularmente, uno de los principales elementos regulados por SNAI1 durante la EMT es el citoesqueleto, una estructura dinámica que permite la plasticidad epitelial, ya que sus fibras y las proteínas asociadas interaccionan con la MEC y con las células vecinas, determinando la forma y el destino de la misma (Baulida y García de Herreros, 2015). El citoesqueleto de actina y miosina se encuentra anclado y estabilizado por los complejos proteicos de las uniones intercelulares, como son las uniones adherentes y las uniones estrechas. SNAI1 actúa como represor, tanto de las uniones celulares (E-cadherina en las uniones adherentes y Claudina/Ocludina en las uniones estrechas) (Ikenouchi et al., 2003), como de los filamentos intermedios epiteliales (Guaita et al., 2002) y promueve la actividad de RhoA, GTPasa que actúa sobre el citoesqueleto contráctil (Baulida y García de Herreros, 2015; Stanisavljevic et al., 2015).

4.1.3. SNAI1 aumenta la recurrencia tumoral

El proceso de EMT inducido por SNAI1 también es necesario para la generación y el mantenimiento de las células madre tumorales o CSCs (del inglés *Cancer Stem Cells*) (Mani et al., 2008; Hollier et al., 2009; Gomez-Casal et al., 2013; Wang et al., 2014; Herrera et al., 2015). Las CSCs se caracterizan por resistencia a la anoikis y a otras agresiones, auto-renovación y potencial de diferenciación a múltiples linajes celulares y son requeridas para el mantenimiento de las células tumorales en los microambientes hostiles que van a darse en los foci metastásicos (Mani et al., 2008; Hollier et al., 2009). Como factor ligado a la formación y mantenimiento de las CSCs, SNAI1 se ha asociado a la resistencia a quimioterapia y radioterapia (Kajita et al., 2004; Bruyere et al., 2010), facilitando la activación de células tumorales residuales en estado durmiente y permitiendo así el desarrollo de nuevos tumores refractarios al tratamiento (Hollier et al., 2009).

5. EL MICROAMBIENTE CELULAR Y SU INFLUENCIA EN EL CÁNCER

En los últimos años, el microambiente tumoral ha sido objeto de una intensa investigación, ya que las alteraciones que se producen en el estroma que rodea el tumor pueden resultar útiles en el pronóstico y generar nuevas dianas terapéuticas. La idea de que las células estromales pueden promover el desarrollo del cáncer fue reconocida por primera vez en 1863, cuando Rudolph Virchow planteó que el cáncer se podía originar en lugares de inflamación crónica (Balkwill y Mantovani, 2001). En 1889, Paget presentó su hipótesis "seed and soil" donde ya se abarcaban todos los componentes del microambiente (Paget, 1889). En 1982, Bissell et al. propone la teoría moderna, donde el microambiente en el cual se desarrollan las células tumorales es tan fundamental para su evolución como las mutaciones genéticas que en ellas se produzcan (Bissell et al., 1982). Así, en las últimas décadas se ha asentado la idea que revela que los tumores no son masas aisladas de células tumorales que proliferan sino que son complejos tejidos compuestos por distintos tipos celulares que participan en interacciones heterotípicas entre sí. Por lo tanto, la biología de los tumores no puede entenderse simplemente enumerando las características de las células tumorales sino que debe considerarse también la contribución del microambiente tumoral (Hanahan y Weinberg, 2011).

El microambiente tumoral está compuesto por varios tipos celulares independientes como son los fibroblastos asociados al tumor, las células endoteliales y linfáticas, los pericitos, las células inmunes y las células derivadas de la médula ósea, además de la MEC en la que se embeben todas las células (Augsten et al., 2010; Worthley et al., 2010).

5.1. LOS FIBROBLASTOS ASOCIADOS AL TUMOR

Los fibroblastos es uno de los tipos celulares más activos dentro del estroma de los tejidos (Xouri y Christian, 2010), donde realizan las funciones de reparación bajo ciertas condiciones fisiológicas. Asimismo, representan el componente principal del estroma del tumor (Räsänen y Vaheri, 2010). Estos fibroblastos han recibido varios nombres: fibroblastos asociados a tumores, fibroblastos asociados a carcinoma o CAFs (del Inglés, *Cancer Associated Fibroblasts*), o miofibroblastos (Beacham y Cukierman, 2005). Son similares a los que se encuentran en el proceso de curación de heridas, aunque en los procesos tumorales, los fibroblastos están constantemente activos.

5.1.1. Una población heterogénea

Molecularmente, los fibroblastos activos se caracterizan por la expresión de varios marcadores. Algunos de los más comunes son α -SMA (del Inglés, *α -Smooth Muscle Actin*), S100A4 o FSP1 (del Inglés, *Fibroblast-Specific Protein 1*) y FAP (del Inglés, *Fibroblast Activation Protein*) (Räsänen y Vaheri, 2010; Xouri y Christian, 2010). Los CAFs son poblaciones celulares heterogéneas y su composición relativa difiere en gran medida entre los diferentes tumores, dentro de un determinado tipo de tumor e incluso entre los tumores individuales (Worthley et al., 2010; Herrera et al., 2013). Esta amplia heterogeneidad podría ser explicada por su origen diverso, ya que los CAFs pueden derivar de fibroblastos residentes, de células progenitoras derivadas de la médula ósea, de células endoteliales, de células cancerosas a través de la EMT y también de otros tipos de células incluyendo las células de músculo liso, pericitos, adipocitos o células inflamatorias (Allen y Louise Jones, 2011).

5.1.2. Interacción con otros tipos celulares

Los fibroblastos activos liberan distintos factores de crecimiento como VEGF, FGF, HGF, TGF- β , EGF o IGF que favorecen el reclutamiento de distintos tipos celulares como las células del sistema inmune y las células endoteliales (Ostman y Augsten, 2009). Además, muchos tipos celulares epiteliales expresan los receptores para algunos de estos factores de crecimiento, y así los fibroblastos pueden incrementar la proliferación de las células epiteliales tumorales (Bhowmick et al., 2004; Ostman y Augsten, 2009).

Otros receptores, sin embargo, son expresados por las células estromales, las cuales responden a los factores liberados por células epiteliales o endoteliales entre otras, aumentando también la proliferación o su estado de activación. Numerosos estudios han demostrado como la

activación del receptor PDGFR- β (del inglés, *Platelet-Derived Growth Factor Receptor- β*) por su ligando, aumenta el reclutamiento y crecimiento de los fibroblastos en el tumor, favoreciéndose así el crecimiento tumoral. Los receptores de PDGF son importantes proteínas reguladoras de las células estromales, por lo que una alta expresión o activación de estos receptores se ha asociado con un peor pronóstico en varios tipos de tumores (Hägglöf et al., 2010; Kodama et al., 2010; Suzuki et al., 2010; Frings et al., 2013; Guo et al., 2013). Por tanto, la relación entre las distintas isoformas de PDGF y la estimulación paracrina y autocrina del tumor ha sido ampliamente estudiada (Pietras et al., 2003; Board y Jayson, 2005).

5.1.3. Mecanismos tumorogénicos

Los CAFs pueden promover el crecimiento y progresión del tumor, favoreciendo mecanismos tumorales (Orimo y Weinberg, 2006) que influyen en el comportamiento de los tumores y el pronóstico de los pacientes (Gout y Huot, 2008). De esta forma, los CAFs se han visto implicados en la remodelación de la matriz extracelular (Beacham y Cukierman, 2005; Calvo et al., 2013; Stanisavljevic et al., 2015), la liberación de factores solubles, la regulación de la migración e invasión de células tumorales y la formación de la metástasis (Orimo y Weinberg, 2006; Sugimoto et al., 2006; Gout y Huot, 2008; De Wever et al., 2014). Además, intervienen en la modulación de la respuesta inmune (Harper y Sainson, 2014), el metabolismo del tumor (Martinez-Outschoorn et al., 2014), promueven la angiogénesis (Orimo et al., 2005), favorecen el mantenimiento de la pluripotencialidad, la resistencia a drogas (Chen et al., 2014; Kinugasa et al., 2014) y están implicados en la metástasis de las células tumorales favoreciendo el remodelado de la MEC (Kalluri y Zeisberg, 2006; Pena et al., 2013).

5.2. LA MATRIZ EXTRACELULAR: NICHOS DINÁMICOS EN CÁNCER

La matriz extracelular (MEC) es una red tridimensional compleja de macromoléculas (colágenos, lamininas, fibronectinas, proteoglicanos y ácido hialurónico) que está presente en todos los tejidos contribuyendo a la fuerza tensional de los mismos (Egeblad et al., 2010).

La función de la MEC va más allá de ser un soporte físico para la elasticidad e integridad del tejido: es una estructura dinámica que sufre una remodelación constante para controlar la homeostasis del tejido (Hynes, 2009). En mamíferos existen dos tipos de MEC con diferencias en localización y composición: 1) la membrana basal, un tipo de MEC especializada que separa el epitelio del estroma que lo rodea y es generada por células epiteliales, endoteliales y estromales; 2) la membrana intersticial del tejido conectivo, que rodea a las células y tiene función de soporte, la cual es producida básicamente por células estromales.

5.2.1. Reservorio de factores de crecimiento

El papel de las uniones que establece la MEC directamente con las células por medio de las integrinas ha sido ampliamente estudiado. Sin embargo, de forma más reciente, numerosos estudios indican que la red de proteínas cargadas de la MEC también regula la biodisponibilidad de factores de crecimientos, como FGFs, HGF y VEGFs, mediante la generación de gradientes (Hynes, 2002, 2009).

5.2.2. Nicho de células madre

Un creciente número de evidencias sugiere que la MEC es un componente no celular esencial del nicho de las células madre adultas, necesaria para el mantenimiento de las propiedades funcionales y el estado de diferenciación de las mismas. Por tanto, una MEC anormal puede inducir la expansión de células madre tumorales y promover su invasión (Lu et al., 2012).

5.2.3. Remodelado y biomecánica

Las propiedades biomecánicas de la MEC regulan varios comportamientos esenciales para la célula como son el destino celular, la diferenciación y la función tisular. En determinadas patologías, como el cáncer, la MEC sufre cambios anormales en sus propiedades físicas, entre las que se incluyen la composición proteica, la orientación de las fibras y la rigidez. Las estructuras que forman las uniones focales, compuestas a su vez por complejos proteicos transmembrana (integrinas) de unión a la MEC y complejos intracelulares (FAK, talina, vinculina,...) de unión al citoesqueleto de la célula, actúan como sensores mecánicos que determinan la respuesta celular a las fuerzas tensionales de la MEC (DuFort et al., 2011).

La respuesta física a las fuerzas mecánicas está controlada por el colágeno, la proteína más abundante de la matriz intersticial. El colágeno se secreta como un precursor formado por varias cadenas- α que constituyen una triple hélice de heterotrímeros, conocida como tropocolágeno, que da lugar al colágeno fibrilar (Mouw et al., 2014). Muchas de las proteínas de la MEC, como el colágeno, interactúan con las células por medio de la FN1, una glicoproteína que se ensambla en dímeros con dominios de unión a otras moléculas de la MEC y a receptores de la membrana celular, guiando la polimerización de las proteínas de la MEC y regulando varios procesos celulares (Mouw et al., 2014). Varios tipos de colágenos presentan una deposición mayor durante la formación de los tumores (Zhu et al., 1995; Kaupila et al., 1998; Huijbers et al., 2010). Además, MECs asociadas a tumores son distintas a las del tejido normal, como se ha visto en tumores de mama, donde las fibras de colágeno se orientan perpendicularmente al frente de invasión y de

forma paralela entre ellas (**Figura 4**). Así, el tejido tumoral en cáncer de mama, puede llegar a ser hasta diez veces más rígido que en el tejido normal (Provenzano et al., 2006; Levental et al., 2009; Stanisavljevic et al., 2015). Parte de esta rigidez se puede atribuir a la actividad de las enzimas lisil oxidasa (LOX) y LOXL2, responsables del entrecruzamiento de las fibras de colágeno entre otras, y que se encuentran sobreexpresadas en varios tipos de cáncer, favoreciendo la invasión tumoral y el mal pronóstico de los pacientes (Le et al., 2009; Levental et al., 2009; Barker et al., 2011).

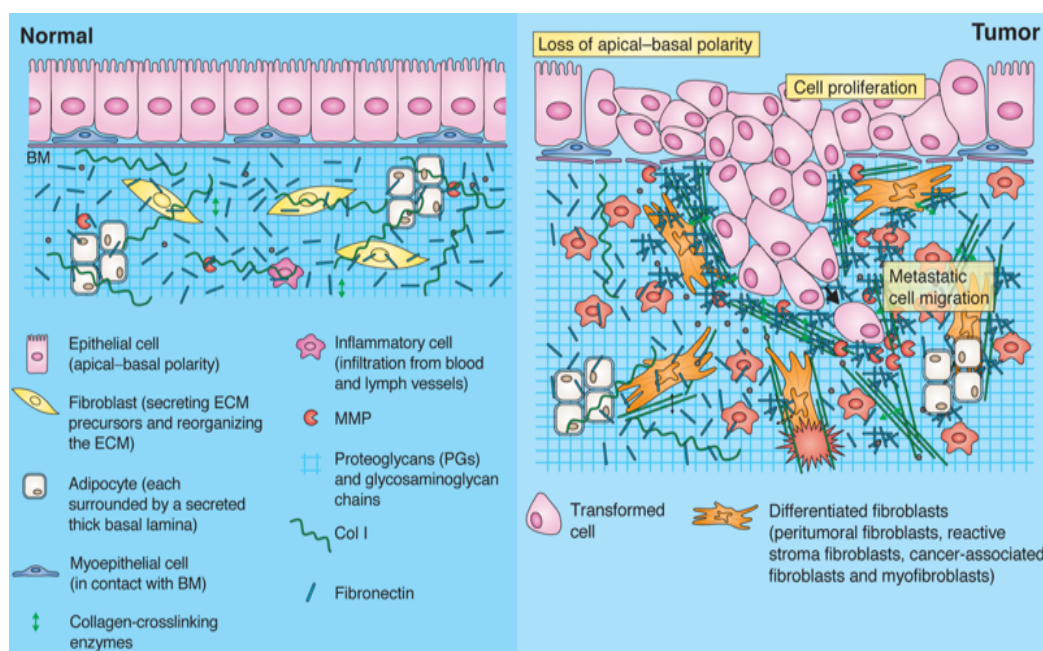


Figura 4. Una MEC anormal favorece la progresión del cáncer. El remodelado de la MEC está muy controlado por las células estromales, así como por las propias células epiteliales, con el fin de asegurar la homeostasis de los tejidos y su función. En condiciones patológicas, como el cáncer, la activación de los fibroblastos residentes (CAFs) y la expresión desregulada de enzimas remodeladoras contribuye a crear una MEC anormal. La degradación de la MEC normal y la producción de fibras perpendiculares al frente tumoral favorece la invasión y metástasis por parte de las células tumorales (Frantz et al., 2010).

5.2.4. Papel en la angiogénesis y linfangiogénesis tumoral

Para que el tumor aumente de tamaño, las células tumorales necesitan nutrientes, oxígeno y eliminar desechos, al igual que ocurre con el desarrollo de órganos. Esta demanda se consigue con la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura ya existente (Davis y Senger, 2005). Este proceso, denominado angiogénesis, comienza con la activación de las células endoteliales en respuesta a diversos estímulos, tras la cual, una célula denominada “*tip cell*” inicia la ramificación del vaso degradando la membrana basal presente en los capilares. Esto permite la extravasación de moléculas que facilitan la proliferación de otras células endoteliales, las “*stalk cell*”, que siguen la migración de la célula iniciadora para formar nuevos capilares inmaduros (Figura 5). Por último, los pericitos son reclutados estabilizando los nuevos vasos (Lu et al., 2012).

Las interacciones de las integrinas celulares con moléculas de la MEC, como el colágeno, estimulan cascadas de señalización que afectan características funcionales como la proliferación, la migración, la organización del citoesqueleto, la forma celular, la supervivencia y la estabilización de los vasos (Whelan y Senger, 2003; Hoang et al., 2004; Kamei et al., 2006; Neve et al., 2014). Otro ejemplo es la FN1 que también puede regular el crecimiento y la supervivencia celular, el citoesqueleto, y la elongación de los vasos (Pierschbacher y Ruoslahti, 1984; Nicosia et al., 1993; Bourdoulous et al., 1998; Sottile et al., 1998; Hocking et al., 2000; S. Kim et al., 2002; Sottile, 2002; Young et al., 2007). Además, condiciones de hipoxia, como las que se dan en tumores, pueden inducir sobreexpresión de la enzima LOXL2, generando rigidez en la MEC y aumentando la formación de “brotes” endoteliales (Bignon et al., 2011).

Asimismo, para la degradación de la MEC, las células endoteliales producen proteinasas como el sistema activador del plasminógeno (PA/plasmina) y metaloproteinasas de la MEC (MMPs) generando subproductos, como la tumstatina, la endostatina o el arresteno, o liberando factores de crecimiento unidos a la MEC, como VEGF que se une a la FN1. Este conjunto de moléculas, denominados “matriquinas”, pueden favorecer o inhibir la angiogénesis afectando a distintas propiedades funcionales de las células endoteliales (Neve et al., 2014).

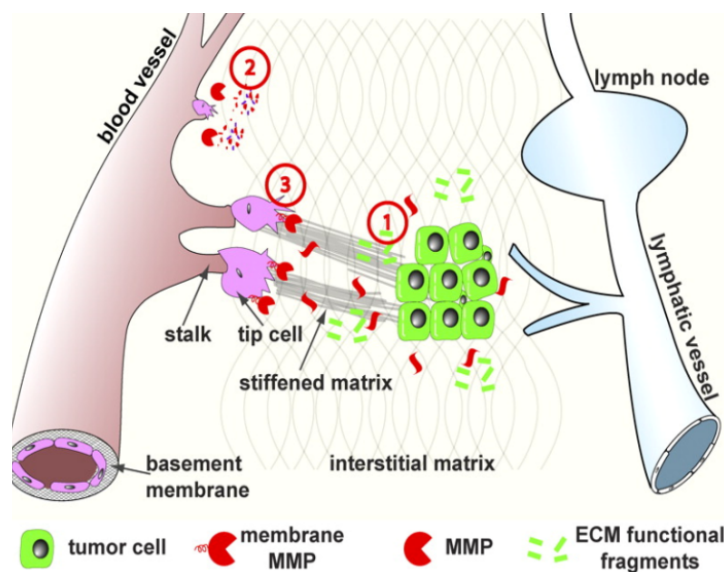


Figura 5. Papel de la MEC en la angiogénesis y la formación de vasos linfáticos. Las células tumorales y estromales producen varios componentes de la MEC y liberan factores para regular la formación de vasos sanguíneos (fase 1). Durante la ramificación de los vasos, las células endoteliales secretan proteasas para degradar la membrana basal y proliferar (fase 2). La extensión de los vasos está impulsado por al menos dos tipos celulares: las “tip cells”, que guían la migración hacia factores quimioatrayentes, y las “stalk cells”, que dependen de la MEC y sus derivados para sobrevivir, proliferar y formar así nuevas estructuras vasculares (fase 3)(Lu et al., 2012).

Por otro lado, igual que ocurre en la angiogénesis, la MEC juega un papel esencial en la formación de vasos linfáticos, los cuales tienen una función muy importante en la metástasis del tumor, ya que pueden transportar tanto células inmunes como células tumorales (Huang et al., 2000; Avraamides et al., 2008) (**Figura 5**).

5.3. CÉLULAS ENDOTELIALES Y PERICITOS

Como se ha comentado anteriormente, las células endoteliales constituyen los vasos sanguíneos necesarios para proveer al tumor de oxígeno y nutrientes y para eliminar los productos de desecho. Al mismo tiempo, la vasculatura tumoral es la mejor ruta para la dispersión de las células metastásicas a partir del tumor primario. En los tumores, los vasos sanguíneos tienen una morfología diferente a la de los vasos normales, formando una estructura irregular y caótica (Ruoslahti, 2002; Bergers y Benjamin, 2003). Además de lo ya comentado respecto a la MEC, existen distintos factores implicados en la inducción, la estabilización, la migración y la ramificación de los vasos que se forman en el tumor, como VEGF, FGF o CXCL8 que estimulan la angiogénesis actuando directamente sobre las células endoteliales. Otras proteínas importantes en la formación de los vasos son angiopoyetina-1 (Ang-1), Dll4 y los miembros de la familia efrinas, así como TGF- β (Shibuya, 2008).

Los pericitos son reclutados en la pared de los vasos sanguíneos en respuesta a factores derivados de las células endoteliales como PDGF o TGF- β , y afectan a la estabilidad y la funcionalidad de los vasos. En los tumores, los pericitos están menos adheridos a los vasos, tienen una morfología diferente (Morikawa et al., 2002) y son menos abundantes que en los vasos normales, lo que puede contribuir a la permeabilidad vascular. Algunos datos experimentales han mostrado que el aumento de pericitos puede mejorar el crecimiento del tumor (Abramsson et al., 2003; Furuhashi et al., 2004). Otros trabajos indican que la reducción de la cubierta de pericitos se correlaciona con metástasis y con mal pronóstico. Sin embargo, su potencial importancia pronóstica está poco estudiada (Yonenaga et al., 2005).

6. COMUNICACIÓN EPITELIO-ESTROMA

En contextos patológicos, como los procesos fibróticos de los órganos o en el estroma reactivo de un tumor primario, los miofibroblastos se mantienen activos mediante un proceso de inflamación crónica en respuesta a una proliferación y remodelación del tejido aberrante. En los microambientes tumorales, el comportamiento de los CAFs es similar al que se da en la cicatrización de tejidos, es por ello que el cáncer se considera como “una herida que nunca cura” (Dvorak, 1986).

Así, la señalización paracrina entre fibroblastos y células epiteliales colabora en la progresión tumoral.

6.1. REGULACIÓN DE SNAI1 POR SEÑALES DEL MICROAMBIENTE

La EMT es un proceso dinámico iniciado por estímulos procedentes del microambiente, incluyendo la MEC y varios factores solubles secretados, como TGF- β , HGF, FGF, EGF o Wnt entre otros, que resultan en la inducción o estabilización de SNAI1. Algunos de estos factores secretados son factores de crecimientos que se unen a los receptores tirosina quinasa (RTKs) y activan rutas como RAS/MAPK o PI3K/Akt implicadas en la expresión de SNAI1.

TGF- β es un potente inductor de la expresión de SNAI1 que, en fases tempranas, ejerce un efecto supresor en el desarrollo tumoral. Sin embargo, SNAI1 estimula resistencia a la apoptosis inducida por TGF- β favoreciendo la progresión del tumor (Massagué, 2008; Heldin et al., 2009; Franco et al., 2010). En etapas más tardías, TGF- β induce EMT sobre-expresando SNAI1 de una forma dependiente de Smad (Peinado et al., 2007). Además, TGF- β afecta a otros procesos como el mantenimiento de células madre mesenquimales (MSCs) (Batlle et al., 2013) o la fibrosis peritoneal (Strippoli et al., 2015), ambos dependientes de los niveles de expresión de SNAI1.

Otro inductor clásico de SNAI1 es la proteína Wnt que, al unirse a su receptor, inhibe la actividad GSK-3 β , lo que resulta en la internalización de SNAI1 al núcleo, que activa la EMT y la metástasis tumoral (K. Kim et al., 2002; Liebner et al., 2004). La citoquina inflamatoria, TNF- α , es capaz de aumentar la expresión de SNAI1 al inhibir a su represor GSK-3 β favoreciendo así el proceso de EMT en células de CCR (Wu et al., 2009; Wang et al., 2013).

Además de los inductores clásicos de SNAI1 en las células del tumor, existen otras muchas citoquinas implicadas en su activación en estudios *in vitro*. Citoquinas como CXCL5 (ENA78), MCP-1 (Li et al., 2016), o el factor de crecimiento de fibroblastos bFGF (Liu et al., 2014) inducen EMT y migración celular mediante la estabilización de SNAI1. También la liberación de IL-8 por macrófagos infiltrados en el tumor puede inducir EMT por medio de la ruta JAK2/STAT3/SNAI1 (Fu et al., 2015).

6.2. SNAI1 COMO MEDIADOR DE SEÑALES PARACRINAS

Como se ha comentado, en situaciones donde el epitelio es alterado, las células epiteliales inician un proceso de señalización para reclutar células implicadas en la reparación del mismo, como fibroblastos y células del sistema inmune. Por ejemplo, queratinocitos orales expresando SNAI1 presentaron un incremento en la habilidad para atraer monocitos así como para invadir a través de la MEC intersticial, mediante la liberación de citoquinas pro-inflamatorias como COX-2, IL-

6, IL-8 y CXCL1 (Lyons et al., 2008). También, usando una línea tumoral de cabeza y cuello, se demostró que la citoquina TNF- α favorece la acetilación de SNAI1, que actúa como activador de la secreción de las citoquinas CCL2, CCL5 e IL-8, facilitando así el reclutamiento de macrófagos y su polarización al fenotipo M2 (Hsu et al., 2014). Asimismo, en CCR se ha demostrado que SNAI1 juega un papel importante en la desdiferenciación de células tumorales mediante la inducción de la expresión de IL-8 (Hwang et al., 2011).

6.2.1. Snai1 en la activación de fibroblastos

Hasta la fecha, el estudio de SNAI1 se ha centrado básicamente en la habilidad del factor de transcripción para iniciar el proceso de EMT en células epiteliales normales o tumorales, pero pocos estudios han analizado el papel inflamatorio o los efectos pro-tumorigénicos de su expresión en el compartimento estromal, concretamente en los fibroblastos.

En condiciones basales, los fibroblastos adultos no expresan SNAI1, sin embargo, estudios recientes demuestran que en ciertas situaciones fisiológicas normales los fibroblastos pueden expresar elevados niveles de SNAI1. Durante la cicatrización de heridas en la piel de ratones, se detectó expresión de SNAI1 en células con forma de huso en estado de proliferación localizadas en la zona de granulación. Además, se observó que ratones con un fondo genético sin expresión de SNAI1 presentaron una cicatrización más lenta que el grupo control (Francí et al., 2006; Stanisavljevic et al., 2015). La relevancia de fibroblastos activos durante la formación de cicatrices viene dada por la necesidad de generar una MEC más rígida que aumente las fuerzas tensionales y los bordes de la lesión puedan aproximarse.

La importancia de la expresión de SNAI1 estromal en determinadas situaciones patológicas también se ha puesto de manifiesto en numerosos estudios. En patologías donde proliferan células del tejido conectivo como son las fibromatosis, los fibrosarcomas y los sarcomas, se observa expresión de SNAI1 en el núcleo de fibroblastos. En este sentido, se ha visto que la sobreexpresión ectópica de SNAI1 en fibroblastos, aumenta la formación de sarcomas en ratones (Francí et al., 2006; Alba-Castellón et al., 2014; Stanisavljevic et al., 2015). En carcinomas de mama con infiltración temprana, la presencia de SNAI1 en el estroma tumoral se asocia con metástasis en los nódulos linfáticos y peor supervivencia global, mientras que la expresión de SNAI1 en células tumorales no mostró una asociación estadísticamente significativa con la supervivencia global (Stanisavljevic et al., 2015). La expresión de SNAI1 en las células endoteliales y fibroblastos del tumor, también predice una peor supervivencia en carcinomas escamosos de faringe (Jouppila-Mättö et al., 2011). De forma similar, en carcinomas de colon, SNAI1 se detectó mayoritariamente

en el estroma tumoral y su reactividad se asoció con la presencia de metástasis distales y peor supervivencia específica en estadios tempranos de la enfermedad, no encontrándose dicha asociación al analizar el compartimento tumoral (Francí et al., 2009).

6.2.2. SnaI1 y su papel en la matriz extracelular

Además de su papel en la liberación de factores solubles y en la activación de los fibroblastos, SNAI1 juega un papel fundamental en las propiedades biomecánicas de la MEC, como demuestran ya varios trabajos de reciente publicación. Algunas citoquinas como TGF- β (Stanisavljevic et al., 2015), TNF- α (Chen et al., 2015) o PDGF-BB (Rowe et al., 2009), activan a los fibroblastos, que modifican la MEC de forma dependiente de SNAI1, aumentando la deposición o la degradación de sus componentes, incrementando la rigidez de la misma y la orientación de sus fibras.

En particular, SNAI1 modifica la composición de la MEC aumentando la expresión de las proteínas que la componen, o secretando proteinasas que participan en su degradación. La FN1 aumenta su expresión por la unión directa de SNAI1 y la subunidad p65-NF- $\kappa\beta$ a su promotor (Stanisavljevic et al., 2011). El efecto de SNAI1 en la orientación de las fibras de la MEC es dependiente del eje de señalización Rho/ α -SMA, necesario para la formación del citoesqueleto, esencial en la fibrillogénesis de la FN1 que guía la polimerización anisotrópica del colágeno. El Colágeno I alineado, que está asociado con peor supervivencia global en pacientes con carcinomas invasivos ductales de mama y con carcinomas hepatocelulares (Zhang et al., 2013; Stanisavljevic et al., 2015; Xie et al., 2015), se une al receptor DDR2 estabilizando SNAI1 que activa, a su vez, la síntesis del Colágeno I y la producción de MMP-14 o MT1-MMP (Shields et al., 2011, 2012; Zhang et al., 2013; Xie et al., 2015). Fibroblastos o células mesenquimales expresando SNAI1 presentan mayor expresión de la proteinasa MMP-14 y, por tanto, tienen una mayor capacidad para movilizar invadopodios y degradar el colágeno, lo que favorece la invasión de las células (Rowe et al., 2009; Lu et al., 2013).



OBJETIVOS

OBJETIVOS

En este trabajo se ha querido profundizar en los mecanismos pro-tumorigénicos mediados por la expresión de SNAI1 en fibroblastos, al contrario de otros trabajos donde SNAI1 se estudia como un inductor clásico de EMT en células epiteliales. Para ello, el trabajo se ha dividido en dos partes con sus objetivos específicos:

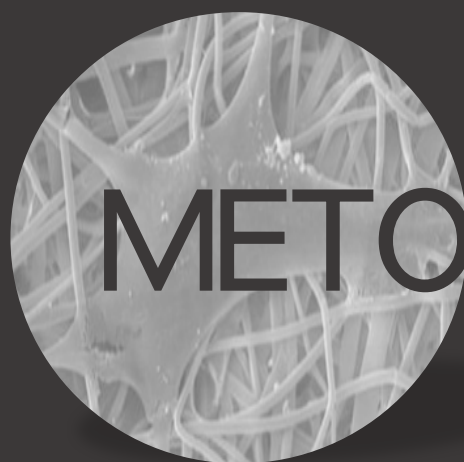
1. El primer objetivo principal se centra en el estudio de la expresión de SNAI1 en fibroblastos y su efecto paracrino sobre la migración y proliferación de células tumorales de cáncer de colon. Los objetivos secundarios a desarrollar son:

- Establecimiento de cultivos primarios de fibroblastos asociados a tumores de colon y de fibroblastos procedentes de mucosa colónica normal de pacientes intervenidos quirúrgicamente en nuestro hospital y su clasificación en función de los niveles de expresión de SNAI1.
- Estudio del potencial de inducción de funciones tumorigénicas de CAFs primarios sobre celulares tumorales de colon en relación con sus niveles de expresión de SNAI1.
- Análisis *in vitro* de las relaciones entre fibroblastos con expresión de SNAI1 manipulada y células de cáncer de colon, determinando los efectos paracrinos de SNAI1 en las capacidades tumorigénicas de migración y proliferación de células de colon.
- Identificación, mediante técnicas de análisis proteómico, de los mediadores de SNAI1 en los efectos paracrinos de migración y proliferación de células tumorales de colon.
- Análisis de la relevancia de la expresión de SNAI1 en fibroblastos en el crecimiento y evolución metastásica de tumores de colon en modelos *in vivo* desarrollados en ratones.
- Estudio en muestras tumorales y normales de pacientes con adenocarcinomas de colon de los niveles de expresión de los candidatos identificados y análisis de su asociación con los niveles de expresión de SNAI1.

2. El segundo objetivo principal analiza el efecto pro-angiogénico de la matriz extracelular producida por fibroblastos activados por PDGF-BB. Los objetivos secundarios a desarrollar son:

- Puesta a punto de la metodología para generar matrices extracelulares (MEC) tridimensionales por fibroblastos estimulados o no con el factor de crecimiento PDGF-BB. Determinación de los efectos de PDGF-BB en el crecimiento de los fibroblastos y sus capacidades para generar dichas MEC.

- Caracterización de las matrices obtenidas con el objetivo anterior, mediante el análisis de la composición de proteínas de la matriz extracelular y la anisotropía de estas.
- Análisis de la respuesta pro-angiogénica de células endoteliales sembradas en MEC derivadas de los fibroblastos estimulados con PDGF-BB.
- Identificación, mediante inhibidores moleculares, de las rutas implicadas en el remodelado de la matriz extracelular y la activación de células endoteliales mediado por PDGF-BB, así como del posible papel determinante de SNAI1 en estos procesos.
- Caracterización de las capacidades de migración y proliferación de las células endoteliales dependientes del remodelado de la MEC mediado por SNAI1 y PDGF-BB.
- Validación en fibroblastos primarios asociados a tumores de colon o de mucosa normal de los efectos observados de PDGF-BB en el remodelado de la matriz mediados por SNAI1.
- Análisis de la asociación entre la expresión de SNAI1 estromal y marcadores angiogénicos en muestras tumorales y normales de pacientes con adenocarcinomas de colon.



METODOLOGIA

METODOLOGÍA

1. CULTIVOS CELULARES

Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5 % de CO₂. De forma rutinaria se descartó contaminación por Mycoplasma utilizando el sistema Mycoplasma Plus TM Primer Set (Stratagen). En la tabla I se indican las líneas celulares utilizadas:

Línea celular	Proveedor	Tipo celular	Especie	Medio de cultivo
LIM1215	Banco celular de Australia	Epiteliales cáncer de colon	Humano	DMEM-C
HT-29	Prof. Antonio García	Epiteliales cáncer de colon	Humano	DMEM-C
SW480-ADH	Prof. Alberto Muñoz	Fenotipo adhesivo de cáncer de colon	Humano	DMEM-C
1.BR3.G	Prof. Antonio García	Fibroblastos de piel	Humano	DMEM-C
MEFs	Prof. Antonio García	Fibroblastos embrionarios	Murino	DMEM-C
HUVECs	ATCC	Endoteliales de vena de cordón umbilical	Humano	EBM-2

Tabla I. Líneas celulares utilizadas en los diferentes ensayos funcionales desarrollados en el estudio. ATCC: American Type Cell Culture Collection. DMEM-C: DMEM-Completo, medio DMEM (Lonza) suplementado con 10 % (V/V) de FBS (del inglés, *Fetal Bovine Serum*) (Lonza), 2 mM de L-glutamina (Invitrogen), penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 ng/mL) (Lonza) y fungizona (0.25 µg/mL) (Roth). EBM-2 (del inglés, *Endothelial Basic Medium-2*, Lonza) suplementado con EGM-2 (del inglés, *Endothelial Cell Growth Medium-2 Bulletkit*, Lonza).

Cuando se indicó, las células se trataron con 20 ng/ml de PDGF-BB (100-14B, Peprotech). Los inhibidores de FAK (10 µM, PF-573228, Sigma), MEK 1/2 (20 µM, UO126, Sigma), PI3K/Akt (30 µM, LY 294002, Sigma), o LOX (10 mM, β-aminopropionitrilo monofumarato, Sigma) se añadieron 1 hora antes del experimento cuando fue necesario.

1.1. GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES

Las líneas celulares humanas de cáncer de colon SW40-ADH, HT-29 expresando de forma estable cDNA de *Snai1* murino (SW480-ADH-*Snai1* y HT-29-*Snai1*) o un vector vacío (SW480-ADH-GFP y HT-29 salvajes) se generaron mediante infección mediada por retrovirus, como describió Pálmer et al. 2004. Los fibroblastos humanos 1.BR3.G expresando *Snai1* de forma estable se obtuvieron mediante transfección, tras llevar las células al 90 % de confluencia, de 24 µg de

pcDNA3.1 o pcDNA3.1 mSnai1-HA usando el reactivo Lipofectamine (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El medio de cultivo se reemplazó por medio de selección con 1 mg/ml de G418 durante 3-4 semanas. Tanto los MEFs (-/-) y (+/+) para SNAI1 como los vectores pcDNA3.1 y pcDNA3.1 mSnai1-HA fueron cedidos generosamente por el Prof. Antonio García de Herreros (Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques, IMIM, Barcelona, España).

1.2. MIGRACIÓN CELULAR

1.2.1. Ensayos de migración celular en co-cultivo

De acuerdo a la **Tabla II**, las líneas celulares tumorales de colon LIM1215 y SW480-ADH se co-cultivaron con un panel de distintas líneas celulares de cáncer de colon humanas (SW480-ADH y HT-29) y de fibroblastos inmortalizados (1.BR3.G) todos ellas con expresión exógena de *Snai1*; MEFs (del inglés, *Mouse Embryonic Fibroblasts*) control y MEFs con *Snai1* deplecionado, y líneas primarias de CAFs y NFs (del inglés, *Normal Fibroblasts*) humanos con distintos niveles de *SNAI1*.

Línea donadora (inserto inferior)	Línea aceptora (inserto superior)
1.BR3.G salvajes / <i>Snai1</i>	SW480-ADH
1.BR3.G salvajes / <i>Snai1</i>	LIM1215
MEFs salvajes/ <i>Snai1</i> (-/-)	SW480-ADH-GFP
NFs/CAFs	LIM1215
SW480-ADH-GFP / <i>Snai1</i>	SW480-ADH-GFP
HT-29 salvajes / <i>Snai1</i>	SW480-ADH-GFP
HT-29 salvajes / <i>Snai1</i>	HT-29

Tabla II. Líneas celulares utilizadas en los diferentes ensayos de migración desarrollados en el estudio.

Las células se co-cultivaron en placas de 6 pocillos con separación física utilizando la tecnología tipo “Transwell” o de insertos, con tamaño de poro de sus membranas de 8.0 μm (Corning Incorporated Costar). Las células “donadoras” con expresión constitutiva de SNAI1 (humano) o expresión ectópica de *Snai1* (murino) se sembraron en el inserto inferior; y las células tumorales de colon en las que se valoraba la capacidad migratoria , o “aceptoras”, en el inserto superior. Los experimentos se realizaron en DMEN conteniendo 1 % FBS, para evitar sesgos por diferencias en la tasa de proliferación. Previamente al co-cultivo, las células “aceptoras” del inserto superior se diferenciaron de las células “donadoras” del compartimento inferior mediante expresión ectópica de GFP (SW480-ADH-GFP) o mediante el marcaje con un fluoróforo

(CellTracker™ Dye, Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. Después de 48 horas las células epiteliales que alcanzaron la cara interna del filtro del inserto o el comportamiento inferior, se recogieron mediante tripsinización y se cuantificaron por fluorescencia con un lector de placas (Tecan Infinite 200Pro) mediante la interpolación con una curva estándar.

1.3. PROLIFERACIÓN CELULAR

Para la determinación de la proliferación y/o viabilidad celular se utilizaron diferentes aproximaciones:

1.3.1. Ensayos de proliferación celular en co-cultivo

Los ensayos de proliferación celular en co-cultivo se llevaron a cabo en placas de 24 pocillos sembrando fibroblastos MEFs salvajes o *Snai1* (-/-), 1.BR3.G salvajes o con expresión exógena de *Snai1* y fibroblastos primarios normales y tumorales, en el compartimento superior del sistema “Transwell” con un poro de 0,4 μm (Corning Incorporated Costar) que impide la migración celular. En el compartimento inferior se sembraron células epiteliales de cáncer de colon SW480-ADH-GFP. Las células se mantuvieron en co-cultivo en medio DMEM al 5% de FBS durante 9 días y la proliferación se analizó cada 3 días con un lector de placas (Tecan Infinite 200Pro) (Excitación: 485 nm; Emisión: 535 nm).

1.3.2. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo (FACS)

Para la obtención de los medios condicionados, los fibroblastos control o con sobreexpresión de *SNAI1*, así como los fibroblastos primarios CAFs, se incubaron con medio sin FBS bovino fetal durante 24 horas. Después, el medio condicionado se recogió y se centrifugó a 1500 rpm durante 6 minutos para eliminar los restos celulares. Las líneas celulares de cáncer de colon LIM1215 y SW480-ADH se incubaron con medio condicionado, diluido 1:4 con medio estándar, durante 24 horas. A continuación, las células se tripsinizaron, se fijaron en suspensión en etanol al 70% (- 20 °C) durante 1 minuto y se trataron con RNAsa 0,2 mg/ml (Qiagen) y yoduro de propidio (Sigma) a 20 $\mu\text{g/ml}$ durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Las fases del ciclo celular se determinaron mediante la cuantificación del contenido celular de ADN evaluado en un MACSQuant Analyser (Miltenyi Biotech). Para el análisis por ordenador, sólo se consideraron las señales procedentes de células aisladas (20.000 células/ensayo) usando el programa FACSDiva (BD Biosciences).

La ploidía en la citometría se recoge en histogramas que se comparan con los de poblaciones celulares control. Normalmente cerca del 90% de las células en un tejido están en fase

G0 y G1 del ciclo celular o lo que es lo mismo en un momento en que no se están dividiendo y que su carga cromosómica está formada por el número de pares de cromosomas propios de la especie. Esto se conoce como 2c. El resto de las células están adquiriendo material de DNA o ya han alcanzado la cantidad doble de DNA (4c) y por tanto están preparándose o dispuestos para la mitosis. Son las fases S y G2 y M del ciclo celular. Por ello el histograma representativo de una población celular normal, está formado por un pico alto y mayor (2c) que corresponde a las fases G0/G1, una fase de meseta de las células en fase S que están sintetizando DNA (fase S), y otro pico menor (4c) correspondiente a las células en fase G2 y M. En base a esto, para el estudio de las células en fase proliferativa, se ha considerado la suma de los porcentajes de las células en fases S y G2-M, resultantes de la cuantificación mediante citometría de flujo.

2. PACIENTES Y MUESTRAS HUMANAS

Este estudio ha sido diseñado y realizado en el Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda con la colaboración del Hospital Virgen de la Salud de Toledo, Hospital General de Guadalajara y del Hospital Virgen de la Concha de Zamora, cuyos respectivos Comités de Ética e Investigación Clínica lo han considerado éticamente correcto y preceptivamente aprobado. Todos los pacientes estudiados eran considerados representantes de la forma esporádica de cáncer de colon, ya que aquellos que pertenecían a familias con poliposis adenomatosa familiar o cáncer de colon hereditario no polipósico, según los criterios de Amsterdam, fueron excluidos. Se utilizó un número diferente de casos para cada uno de los estudios que conforman este trabajo, así:

- La primera parte del presente trabajo, el estudio de los efectos paracrinos de SNAI1 sobre las células epiteliales de cáncer de colon, se basó en dos series consecutivas de 50 y 65 pacientes sometidos a cirugía entre los años 1998 y 2003. La primera cohorte de pacientes consistió en un sub-grupo de una cohorte descrita previamente por Peña et al. 2005, y la segunda, un sub-grupo de otra cohorte previamente descrita por Herrera et al. 2013. Además, para el establecimiento de los cultivos primarios de CAFs y fibroblastos normales (NFs), se emplearon 13 muestras de tejido tumoral y 5 de tejido normal de pacientes con cáncer de colon operados entre enero y diciembre del 2011.

- En la segunda parte de este trabajo, el estudio del efecto de la matriz extracelular mediado por SNAI1, se reclutaron muestras de tejido tumoral de 40 pacientes operados de cáncer de colon. Se realizaron secciones de 2 a 4 μm de grosor del tejido de estudio (embebido previamente en parafina) para ser procesadas según los protocolos estándar antes de ser incubadas con los anticuerpos primarios durante toda la noche.

2.1. ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS PRIMARIOS DE FIBROBLASTOS

El establecimiento de los cultivos primarios de fibroblastos se realizó a partir de explantes de tejido fresco de muestras de tejido normal o tumoral de pacientes con cáncer de colon siguiendo el protocolo descrito por Herrera et al. 2016. Brevemente, las muestras de tejido se cortaron en pequeñas piezas ($2-3 \text{ mm}^3$) y se incubaron con FBS suplementado con penicilina (200 U/ml), estreptomicina (200 $\mu\text{g/ml}$), anfotericina B (2,5 $\mu\text{g/ml}$) y gentamicina (100 $\mu\text{g/ml}$). Cuando se observó el crecimiento de los fibroblastos, el medio de crecimiento se reemplazó por medio de cultivo FBM (del inglés, *Fibroblast Basal Medium*; Lonza) suplementado con FGM-2 Bulletkit (del inglés, *Fibroblast Growth Medium*, Lonza) para facilitar el crecimiento celular. Se descartó el tejido remanente y los fibroblastos primarios normales y tumorales en crecimiento se mantuvieron de manera rutinaria con medio de cultivo FBM a una temperatura de 37 °C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO_2 .

La propagación de los cultivos primarios se realizó en un ratio de 1 a 2 tal como recomienda la ATCC Cell Culture Technical Resource (www.atcc.org), por lo tanto, el número de pases se corresponde con el número de duplicaciones celulares. Todos los experimentos del estudio se realizaron con CAFs o NFs con un máximo de 7 pases, siendo excluidos aquellos cultivos que entraron en senescencia.

3. SENESCENCIA CELULAR

Se determinó el grado de senescencia celular de los cultivos primarios de fibroblastos de colon mediante el uso del kit “Senescence β -Galactosidase Staining Kit” (Abcam), según las instrucciones del fabricante. En primer lugar, se cultivaron las células en placas de 24 mm (Biosciences) durante 24 h antes de llevar a cabo el procedimiento de marcaje y, posteriormente, se tomaron 8 imágenes representativas de distintas áreas del cultivo para determinar el número de células positivas y por tanto senescentes.

4. INMUNOFLUORESCENCIA

La inmunofluorescencia se llevó a cabo para la caracterización de los fibroblastos primarios establecidos (marcaje de Vimentina, α -SMA, y panCitoqueratina), para el análisis de la expresión de SNAI1 y para la cuantificación de proteínas de la MEC (Colágeno I y FN1):

- Los fibroblastos primarios se cultivaron en placas de cultivo 1,8 cm² (Thermo Fisher Scientific) durante 24 horas. El día siguiente las células se lavaron dos veces con PBS (Phosphate Buffered Saline; Lonza) y se fijaron con paraformaldehído al 4 % frío durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de 5 lavados seguidos con PBS (el último con Tween al 0.05 %), las células fijadas se bloquearon con Odyssey Blocking Buffer (Li-cor Biosciences) 1 hora a temperatura ambiente y se incubaron con los anticuerpos primarios específicos para panCITOQUERATINA (ab6401, Abcam), VIMENTINA (ab92547, Abcam) y α -SMA (ab7817, Abcam) durante la noche a 4 °C. El día siguiente, las muestras se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario correspondiente según la especie marcado con IgG Alexa-Fluor 488 ó 546 (Invitrogen). Después de 4 lavados con PBS, las preparaciones fueron montadas con “Vectashield Hard-Set mounting media” conteniendo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, HCl) para la visualización de los núcleos celulares (Vector Laboratories Inc.). Las preparaciones se examinaron con un microscopio de Epifluorescencia (Nikon Eclipse Ti-S Epifluorescence microscope) equipado con una cámara digital DS-L2 (Nikon). Se tomaron imágenes representativas de diversas áreas de cada cultivo para determinar el porcentaje de células positivas.
- El protocolo de marcaje de las matrices 3-D generadas *in vitro* fue idéntico al anterior, con la modificación de que las matrices se generaron en placas de 6 ó 24 pocillos. Los anticuerpos primarios utilizados en este caso fueron: Colágeno I (ab34710, Abcam) y FN1 (A0245, Dako). Las imágenes de las matrices 3D se examinaron con un microscopio de confocal TCS SP5 (Leica Microsystems) equipado con un objetivo 20X (N.A. 0,7) y un zoom óptico de 3X. La cuantificación, mediante fluorescencia, de las proteínas depositadas en la matriz tras el lisado celular (Colágeno I y FN1) se realizó por densitometría usando el equipo Odyssey Infrared Imaging System (Li-COR Biosciences) y una compensación de foco de 3 mm.
- La inmunofluorescencia de SNAI1 en los fibroblastos tratados con PDGF-BB se llevó a cabo siguiendo un procedimiento distinto a los anteriores, dada la inestabilidad de la proteína y su localización celular. Los fibroblastos BJ-hTERT se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio en placas de 24 pocillos y se incubaron en medio DMEM con 10 % FBS. Tras 24 horas de incubación, se cambio el medio a DMEM sin FBS conteniendo 20 ng/ml de la proteína recombinante PDGF-BB (Peprotech) y las células se mantuvieron en cultivo durante 1, 4 y 24 horas. Tras la incubación las células se fijaron con una mezcla 1:1 de paraformaldehído al 4 % y metanol 100 %, previamente enfriada a -20 °C durante 10 minutos. Tras lavar con PBS, las células se permeabilizaron con SDS al 1 % durante 5 minutos y se volvió a lavar 3 veces

con PBS. Después, las células se incubaron 1 hora a 4 °C en una solución de urea 6 M con glicina 0,1 M a pH 3,5 para desenmascarar los epítomos, permitiendo la unión del anticuerpo, y reducir el fondo en el marcaje. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS-Tween al 0.05 % y se bloqueó durante 1 hora a 37 °C con Odyssey Blocking Buffer (Licor Biosciences). A continuación, las células fijadas se incubaron durante la noche a 4 °C con el anticuerpo primario de SNAI1 EC3 (Francí et al., 2006). Al día siguiente, las muestras se lavaron 3 veces con PBS-Tween al 0.05 % y se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario correspondiente a la especie marcado con IgG Alexa-Fluor 488 ó 546 (Invitrogen) conteniendo además TO-PRO-3 Iodide (T3605, Thermo Fisher) para la visualización de los núcleos celulares. Después de 3 lavados con PBS-Tween al 0.05 %, las preparaciones fueron montadas con “Vectashield Hard-Set mounting media” (Vector Laboratories Inc.) y se examinaron con un microscopio confocal TCS SP5 (Leica Microsystems) equipado con un objetivo 20X (N.A. 0,7) y un zoom óptico de 3X. Se tomaron imágenes representativas de diversas áreas de cada cultivo para determinar el porcentaje de células positivas.

5. INMUNOHISTOQUÍMICA

Se realizaron secciones de 2 a 4 µm de grosor del tejido de estudio (embebido previamente en parafina) para ser procesadas según los protocolos estándar antes de ser incubadas con los anticuerpos primarios durante toda la noche. Se emplearon anticuerpos específicos para FAP (del inglés *Fibroblast Activation Protein*, IMG-72094, Imgenex), α -SMA (1A4, Abcam) SNAI1 EC3 (Francí et al., 2009), Ki67 (ab21700, Abcam), CDH1 (E-CADHERINA, 610182, BD Transduction Laboratories), y CD34 (sc-1506, Santa Cruz Biotechnology). Se utilizaron anticuerpos distintos en función del estudio:

- Para la primera parte del trabajo, la inmunohistoquímica se desarrolló para la cuantificación de marcadores específicos de fibroblastos activos (FAP y α -SMA) y SNAI1, así como para la determinación de un marcador epitelial (CDH1) y otro de proliferación celular (Ki67) en las muestras de tejido tumoral y de mucosa normal de los pacientes con cáncer de colon o en las muestras de los tumores derivados de células tumorales de colon y fibroblastos coinyectados en ratones desnudos.
- Para la segunda parte del trabajo, la inmunohistoquímica se utilizó para determinar la asociación entre un marcador específico de célula endotelial (CD34) y la presencia de SNAI1 en el estroma tumoral en las muestras de tejido tumoral y de mucosa normal de los

pacientes con cáncer de colon. En la evaluación de los datos obtenidos, se consideró “baja”, “media” o “alta” la expresión del marcador molecular CD34 en función del porcentaje de células positivas para cada muestra. El análisis fue evaluado por dos patólogos de manera independiente.

La inmuno-detección se realizó según los procedimientos estándares, con incubación en presencia del anticuerpo primario toda la noche y posterior revelado con el sistema peroxidasa marcada con estreptavidina-biotina (LSA; Dako) usando 3,3' Diaminobenzidine (DAB) como sustrato. El inmuno-marcaje se realizó usando el dispositivo de inmuno-tinción automática TechMate 500 (Dako). Como control de la técnica, se realizaron incubaciones omitiendo el anticuerpo específico o con anticuerpos no relacionados. Se analizaron los distintos datos con el fin de establecer la asociación de los diferentes marcadores con la expresión de SNAI1 en las muestras de tejido tumoral de los pacientes con cáncer de colon y en las muestras de tumores murinos.

6. EXTRACCIÓN DE ARN DE LAS MUESTRAS Y TRANSCRIPCIÓN REVERSA

6.1. PROCEDIMIENTO

Se utilizaron protocolos diferentes en función del estudio:

- Para la extracción de ARN total del tejido crioconservado se usó el kit de extracción de ARN “Rneasy Mini Kit” (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se emplearon aproximadamente 30 mg de cada muestra de tejido normal y tumoral de cada paciente que fueron disgregadas mecánicamente y homogenizadas mediante la tecnología MagNA Lyser (Roche Diagnostics) siguiendo las instrucciones del fabricante.

- La extracción de ARN total de las muestras de células comerciales o primarias se realizó añadiendo directamente el reactivo TRIsure (Bioline) en las placas de cultivo y continuando el procedimiento con fenol/cloroformo según recomienda el protocolo del fabricante.

6.2. CUANTIFICACIÓN DE LAS EXTRACCIONES

Las concentraciones de ARN de cada extracción de las muestras fueron calculadas midiendo la absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc.). De cada una de las muestras se prepararon diluciones de 100 ng/μl de ARN, las cuales fueron posteriormente usadas en las reacciones de RT-PCR. El ratio de las absorbancias 260 nm/280 nm oscilaba en todas las muestras de tejido utilizadas entre 1.6 y 1.8, el cual es considerado óptimo para muestras diluidas en agua.

6.3. TRANSCRIPCIÓN REVERSA

El ARN total de cada muestra fue retrotranscrito a ADNc mediante el kit GeneAmp Gold PCR core Kit (PE Biosystems) según las instrucciones del fabricante, utilizando 400 µg de ARN de cada muestra para la reacción de retrotranscripción. Durante el proceso, las muestras se sometieron a un ciclo de 10 minutos a 25 °C seguido de otro ciclo de 12 minutos a 42 °C lo cual dio lugar a la síntesis de ADNc, que posteriormente fue amplificado mediante una reacción de PCR a tiempo real.

6.4. CUANTIFICACIÓN A TIEMPO REAL (REAL TIME PCR)

Se usó la media geométrica de tres genes de referencia, *TBP* (Proteína de Unión a TATA), *SDHA* (Subunidad A del complejo Succinato Deshidrogenasa) y *UBC* (Ubiquitina C) para la cuantificación relativa de la expresión de los genes de interés, como fue descrito por (Vandesompele et al., 2002). Los cebadores utilizados, descritos en la **Tabla III** y **Tabla IV**, fueron diseñados específicamente situando un intron entre el cebador directo y el reverso para evitar posibles contaminaciones con ADN. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando la tecnología Light-Cycler (Roche Diagnostics) con los reactivos del kit LightCycler-FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I (Roche Diagnostics).

El proceso consta de un primer paso de desnaturalización a 95 °C durante 10 minutos. A continuación entre 35 y 45 ciclos los cuales contenían a su vez, un paso de desnaturalización de 2 segundos a 95 °C, un paso de anillamiento de cebadores durante 5 segundos y un último paso de elongación a 72 °C durante otros 6 segundos al final de los cuales se realizaba la adquisición de fluorescencia. Por último, las curvas de melting de los productos de PCR, temperatura a la que se encuentran desnaturalizadas la mitad de las bases de un amplicón específico, eran analizadas para verificar la reacción de PCR y los productos amplificados eran secuenciados mediante un secuenciador ABI Prism 377 DNA (PE Applied Biosystems) para confirmar la amplificación específica del gen deseado.

Las concentraciones obtenidas para cada gen problema se normalizaron con la media geométrica de aquellas obtenidas para los genes de referencia según la fórmula: expresión del gen problema/media geométrica de la expresión de los dos genes de referencia, con lo que se obtiene un valor de expresión relativa, es decir, se determinan los niveles de ARNm del gen problema en relación a los niveles de ARNm de los genes de referencia. En el caso de los tumores, el cociente de los valores obtenidos en los tejidos tumoral y normal de cada paciente nos indicó cuantas veces más o menos es expresado nuestro gen problema en el tejido tumoral con respecto al normal. Se asignó un valor arbitrario (0.01), correspondiente a la mitad del valor mínimo detectado en la serie

de pacientes, a aquellas muestras de tejido normal o tumoral en las cuales el gen de estudio no pudo ser detectado, pero sí se detectó la expresión del gen de referencia. Los pacientes en los que no se detectó el gen de referencia en la muestra tumoral o en la normal fueron excluidos del estudio.

Genes	Secuencia 5'→3'	Temperatura de anillamiento (°C)
TBP	directo: TCTGGGATTGTACCGCAGC reverso: CGAAGTGCAATGGTCTTTAGG	59
SDHA	directo: TGGGAACAAGAGGGCATCTG reverso: CCACCACTGCATCAAATTCATG	59
UBC	directo: ATTTGGGTCGCGGTTCTTG3 reverso: TGCCTTGACATTCTCGATGGT3	59

Tabla III. Secuencias de los cebadores utilizados y condiciones para la amplificación de los genes de referencia.

Genes	Secuencia 5'→3'	Temperatura de anillamiento (°C)
SNAI1	directo: CACTATGCCGCGCTCTTTC reverso: GGTCGTAGGGCTGCTGGAA	69
Snai1 (murino)	directo: TGGAAAGGCCTTCTCTAGGC reverso: ACATCCGAGTGGGTTTGG	68
α-SMA	directo: CTCCCAGGGCTGTTTTCCC reverso: GCTTCGTACCCACGTAGC	59
FSP1	directo: CTAAAGGAGCTGCTGACCCG reverso: GAAGTCCACCTCGTTGTCCC	59
FAP	directo: TCAAACTCAGCACAGATTGC reverso: TTAGGAAGTGGGTCATGTGG	59
MCP-3	directo: TCACCCTCCAACATGAAAGC reverso: TCAGCACAGATCTCCTTGTC	59
Mcp-3 (ratón)	directo: CCCAAGAGGAATCTCAAGAGC reverso: CTTCAAGGCTTTGGAGTTGG	59

Tabla IV. Secuencias de los cebadores utilizados y condiciones para la amplificación de los marcadores estromales y de proteínas de la matriz extracelular analizados.

7. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL

Para la extracción de proteína total de cultivos celulares, las células se lavaron con PBS y posteriormente se lisaron durante 15 minutos en hielo con la solución RIPA (Sigma), a la que se añadió un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail 100X, Thermo Scientific). El lisado resultante se centrifugó a 15.000 rpm durante 20 minutos para eliminar los componentes no proteicos recuperándose el sobrenadante, que se conservó para la posterior detección de proteínas por inmunotransferencia. La concentración de proteína total se cuantificó usando el kit PierceTM BCA Protein Assay (Thermo Scientific).

8. INMUNOTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT)

Se desnaturalizaron entre 30 y 60 µg de proteína total en buffer Laemmli 5X a 95 °C y se analizaron en geles de SDS-poliacrilamida al 10 ó al 12 %, dependiendo del peso molecular de la proteína en estudio. A continuación, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa con un diámetro de poro de 0.45 µm (BioRad) utilizando el sistema iBlot Western Blotting System (20 V durante 7 minutos) y los reactivos iBlot Gel Transfer Stacks Nitrocellulose (Invitrogen Life Technologies). Las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con la solución Odyssey Blocking Buffer (Li-COR Biosciences) y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes durante toda la noche a 4 °C. Tras tres lavados de 5 minutos con PBS conteniendo 0.01 % del detergente Tween20, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón o anti-IgG de conejo, según corresponda, conjugados con IRDye 800 o IRDye700 (Rockland Immunochemicals) diluidos en solución de bloqueo 1:5000. Después de eliminar los restos de anticuerpo secundario con tres lavados de 5 minutos con PBS al 0.01 % Tween20 y dos lavados con PBS, las bandas fueron visualizadas y cuantificadas por densitometría usando el equipo Odyssey Infrared Imaging System (Li-COR Biosciences). La proteína β-actina se utilizó para la normalización de las bandas del resto de proteínas estudiadas.

A continuación se resumen las características de los anticuerpos utilizados:

Antígeno	Conjugación	Proveedor	Referencia
β Actina	-	Abcam	ab8226
SNAI1	-	SNAI1 EC3 (Francí et al., 2006)	
p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204)	-	Cell Signaling	9101
ERK 1/2	-	Cell Signaling	9102
p-Akt	-	Cell Signaling	4060
Akt	-		4691
p-FAK (Tyr576/577)	-	Cell Signaling	3281
FAK	-	Cell Signaling	3285
PY99 (Tyr99)	-	Santa Cruz	sc-7020
PDGFR- β	-	Cell Signaling	3169
VCAM1	-	Abcam	ab98954
VE-CADHERINA	-	Abcam	ab33168
MMP-14	-	Abcam	ab53712
MMP-9	-	Abcam	ab38898
IgG conejo	IRDye800	Rockland Immunoc.	611-145-002
IgG conejo	IRDye700	Rockland Immunoc.	611-700-127
IgG ratón	IRDye800	Rockland Immunoc.	610-145-121
IgG ratón	IRDye700	Rockland Immunoc.	610-700-124

Tabla V. Anticuerpos usados para la inmunodetección y cuantificación por inmunotransferencia de proteínas específicas.

9. ARRAY DE CITOQUINAS HUMANAS

Las líneas celulares de fibroblastos humanos transfectados de forma transitoria con Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 1.BR3.G-pcDNA3 y 1.BR3.G-mSnai1 se cultivaron a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂ en DMEM con 10 % de FBS durante 24 horas después de la transfección. Después, el medio completo se reemplazó por DMEM libre de FBS y se incubó durante 24 horas. Al día siguiente el medio condicionado de los fibroblastos se recogió y se centrifugó a 1500 rpm y se

filtró con un filtro de 0,22 μm para eliminar los restos celulares. El medio condicionado de cada tipo celular transfectado se incubó con membranas conteniendo anticuerpos para 80 citoquinas humanas (RayBio Human Cytokine Antibody Array 5, RayBiotech Inc.). El procedimiento se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante y el complejo de unión se detectó con Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor) a 800 nm usando Streptavidin DyLight 800 Conjugated (Rockland Immunochemicals). El experimento se llevó a cabo con 4 réplicas biológicas para validar los resultados correctamente.

10. MATRICES 3-D DERIVADAS DE FIBROBLASTOS

La preparación de las matrices extracelulares tridimensionales producida por fibroblastos se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por (Castelló-Cros y Cukierman, 2009). Todos los pasos se realizaron bajo condiciones de esterilidad. Las placas de cultivo se trataron con una solución de gelatina al 0,2 % (Sigma) durante 1 hora a 37 °C seguido por un lavado con PBS para eliminar los restos de la misma. Una vez retirado el PBS, se realizó un tratamiento con glutaraldehído al 1 % (Sigma), diluido en PBS, durante 30 minutos a temperatura ambiente para entrecruzar la gelatina, seguido de 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS. Después, se añadió etanolamina 1 M (Sigma) diluida en agua estéril a cada pocillo y se incubó durante 30 minutos. De nuevo, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS. A continuación, fibroblastos BJ-hTERT o MEFs se sembraron a una concentración de 1×10^5 células/ml añadiendo 2 ml en placas de 6 (para los ensayos de formación de túbulos y extracción de proteína), 750 μl en placas de 24 (inmunofluorescencia) o 100 μl en placas de 96 pocillos (proliferación).

Cuando los fibroblastos alcanzaron su máxima confluencia, se reemplazó el medio por DMEM completo con 10 % de FBS al cual se añadió ácido ascórbico (Sigma), filtrado y diluido en DMEM completo a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$, así como el tratamiento correspondiente según el experimento llevado a cabo. Cuando se indicó, las células se trataron con 20 ng/ml de PDGF-BB (100-14B, Peprotech) y los inhibidores de FAK (10 μM , PF-573228, Sigma), MEK 1/2 (20 μM , UO126, Sigma), PI3K/Akt (30 μM , LY 294002, Sigma), o LOX (10 mM, β -aminopropionitrilo monofumarato, Sigma) se añadieron 1 hora antes del experimento cuando fue necesario.

El medio era reemplazado cada dos días durante 6-8 días. Tras el tratamiento, los cultivos se observaron al microscopio con el fin de comprobar que la adhesión de los fibroblastos era correcta y que la matriz se encontraba en buen estado. Además, se tomaron imágenes representativas de diversas áreas de cada cultivo cuando fue necesario utilizando un microscopio de Epifluorescencia

(Nikon Eclipse Ti-S Epifluorescence microscope) equipado con una cámara digital DS-L2 (Nikon) con el fin de cuantificar el grado de orientación de los fibroblastos utilizando el programa ImageJ.

Para la lisis de los fibroblastos y el aislamiento de las matrices se llevaron a cabo dos lavados con PBS atemperado a 37 °C, seguidos por un tratamiento con detergente alcalino (0,5 % (v/v) Triton X-100 y 20 mmol/L NH_4OH) durante 10 minutos a 37 °C. Tras comprobar la ausencia de células, se diluyeron los restos celulares añadiendo PBS lentamente para evitar la formación de turbulencias. El PBS se retiró cuidadosamente inclinando ligeramente las placas conteniendo las matrices. Tras repetir el lavado una vez más, las matrices quedaron adheridas a la placa y libres de células, dando lugar a una matriz 3D similar a las generadas *in vivo*. Finalmente, las matrices aisladas se utilizaron para inmunofluorescencia (cuantificación de la producción y orientación de las fibras de distintas proteínas de la matriz) o para siembra de células endoteliales para diferentes ensayos (formación de túbulos, extracción de proteína y proliferación). En función del tipo de ensayo a realizar, las matrices siguieron distintos protocolos:

- Inmunofluorescencia: Las matrices se fijaron y se marcaron siguiendo el protocolo indicado en el apartado “Inmunofluorescencia e inmunohistoquímica”.
- Ensayos con células endoteliales: Las matrices extraídas se bloquearon con BSA 2 % desnaturalizado por calentamiento en ebullición durante 7 minutos. Tras realizar dos lavados con PBS, las matrices se guardaron a 4 °C en PBS conteniendo 100 U/ml penicilina and 100 µg/ml estreptomycina hasta su uso. A continuación, las matrices se precalentaron a 37 °C, se retiró el PBS y se sembró distinto número de células endoteliales HUVECs (se detallan a continuación) en función del ensayo.

10.1. ENSAYO DE FORMACIÓN DE TUBULOS

Para el ensayo de formación de túbulos en matrices 3-D derivadas de fibroblastos, las células HUVECs se cultivaron en medio EBM-2 al 2 % de FBS hasta alcanzar su máxima confluencia. Después, el medio fue reemplazado por medio EBM-2 sin FBS y las células se incubaron durante 8 horas. Posteriormente, las células se tripsinizaron y se sembraron 2×10^5 células, en medio sin FBS, en una placa de 6 pocillos conteniendo las matrices derivadas de fibroblastos creadas siguiendo el procedimiento estándar indicado en el apartado anterior. Las células se cultivaron durante 16 horas y, finalmente, las estructuras tubulares similares a capilares se fotografiaron utilizando un microscopio de Epifluorescencia (Nikon Eclipse Ti-S Epifluorescence microscope) equipado con una cámara digital DS-L2 (Nikon) (**Figura VII**).

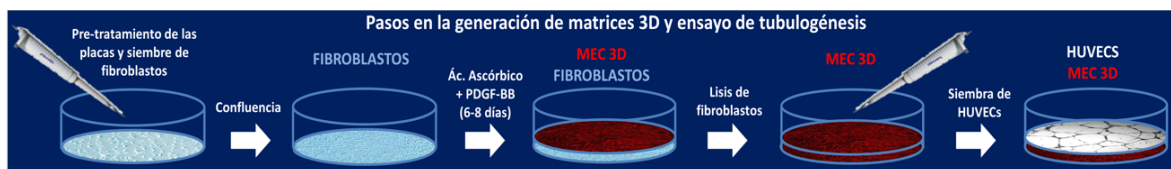


Figura 6. Representación esquemática de la progresión del ensayo de tubulogénesis realizado sobre matrices 3D derivadas de fibroblastos.

10.2. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN EN MATRICES 3-D DERIVADAS DE FIBROBLASTOS

Se generaron matrices tridimensionales en placas de 96 pocillos siguiendo el protocolo estándar indicado con fibroblastos MEFs control o *Snai1* (-/-) tratados con 20 ng/ml de PDGF-BB según experimentación llevada a cabo. Una vez aisladas y bloqueadas las matrices se sembraron las células HUVECs (5.000 células/pocillo) sobre ellas y se incubaron 72 horas en medio estándar EBM-2 con 2 % de FBS. A continuación, el medio fue reemplazado por medio estándar conteniendo un marcador de fluorescencia (CellTracker™ Green CMFDA Dye, Invitrogen), según las instrucciones del fabricante y las células se cultivaron durante 30 minutos. Finalmente, tras dos lavados con PBS seguidos de centrifugaciones para eliminar los restos del marcador, se cuantificó la proliferación por fluorescencia con un lector de placas (Tecan Infinite 200Pro) (Excitación: 485 nm; Emisión: 535 nm).

10.3. ENSAYO DE INVASIÓN MEDIANTE CULTIVO ORGANOTÍPICO

Para estudiar la invasión de las células endoteliales HUVECs se utilizó un sistema de co-cultivo tridimensional (basado en el protocolo descrito por Horie et al. 2015) con fibroblastos MEFs y colágeno con el fin de mimetizar la influencia del estroma *in vitro*. Así, los geles de colágeno se prepararon mezclando 5 volúmenes de colágeno tipo I (3 mg/ml, Sigma), 2 volúmenes de DMEM completo, 1 volumen del tampón de reconstitución (50 mM NaOH, 260 mM NaHCO₃, 200 mM HEPES) y 1 volumen de FBS con fibroblastos MEFs control o MEFs *Snai1* (-/-) (resuspendidos previamente a una concentración de 5×10^5 células/ml). Sobre cada inserto del sistema “Transwell” con un poro de 0,4 μ m (Corning Incorporated Costar) de una placa de 6 pocillos se añadieron 1,8 ml de la mezcla y se dejó polimerizar a 37 °C durante 1 hora. Una vez que el gel solidificó, el compartimento inferior de la placa o pocillo se rellenó con 2,5 ml de un medio de cultivo 3D (mezcla 1:1 de DMEM completo para fibroblastos y EBM-2 al 2 % de FBS para HUVECs). Posteriormente, las células HUVECs fueron tripsinizadas y resuspendidas en medio 3D a una concentración de 2×10^5 células/ml, para añadirlas después sobre el gel del inserto conteniendo los fibroblastos. Este sistema se incubó durante la noche a 37 °C. A partir de este momento, cada 2 días, el medio de ambos compartimentos, inserto y pocillos, era reemplazado por medio de cultivo 3D al cual se había añadido PDGF-BB (10 ng/ml) según experimentación realizada. Tras 6 días, se retiró todo el

medio de ambos compartimentos añadiéndose 1 ml de medio 3-D en cada pocillo de la placa y quedando así el cultivo de células endoteliales de la parte superior del gel expuesto al aire. Con esta maniobra se facilita la invasión de las células endoteliales hacia el interior del gel de colágeno con el medio de cultivo como quimioatrayente de la invasión (**Figura VIII**). El gel incluyendo las distintas células se incubó durante 5 días más y se fijó en PFA al 4 % durante la noche a temperatura ambiente para, finalmente, embeberse en parafina. Se cortaron secciones verticales de 4 μm que fueron teñidas con hematoxilina-eosina y se realizó la inmunofluorescencia (ver apartado Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia) para el marcador nuclear TO-PRO-3 Stain (Thermo Fisher) y para las proteínas endoteliales CD31 y VE-Cadherina (CDH5), con el fin de visualizar las células endoteliales en invasión y distinguirlas así de los fibroblastos.

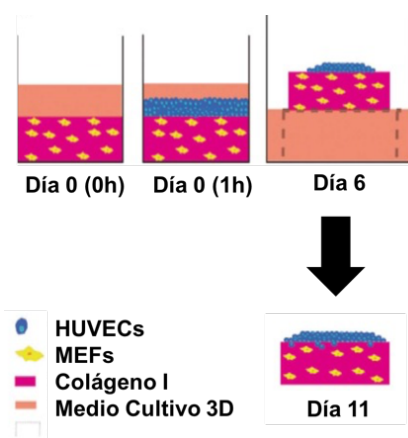


Figura 7. Representación esquemática de la progresión del ensayo de invasión de células HUVECs en co-cultivo con MEFs (cultivo organotípico).

11. XENOTRASPLANTES TUMORALES EN RATÓN

Se inocularon subcutáneamente en el flanco de ratones atímicos (ratones Hsd:Athymic Nude-Foxn1nu, hembras, edad de 6-8 semanas, Harlan Laboratories) una suspensión celular en medio DMEM completo conteniendo los siguientes tipos celulares en función de cada grupo de tratamiento:

1. Grupo control: 1×10^6 células HT29
2. Grupo Snai1 (+/+): 1×10^6 células HT29 + 10^5 MEFs Snai1 (+/+)
3. Grupo Snai1 (-/-): 1×10^6 células HT29 + 10^5 MEFs Snai1 (-/-)

El volumen tumoral se controló cada 2 días a partir de la primera semana y se determinó mediante los valores de diámetro obtenidos con un calibre y aplicados a la siguiente fórmula:

ancho² x largo x 0.52. El estudio fue aprobado por CEEA del Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM, Barcelona, España), donde se llevó a cabo el experimento.

12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En general todos los análisis estadísticos presentados en este trabajo se han llevado a cabo con el test estadístico T-student. Previamente se evaluó la igualdad de la varianza mediante el test de Levene.

Excepcionalmente y debido al tipo de datos a tratar, la correlación entre la expresión de SNAI1 y la inducción de la migración o la proliferación por los CAFs se realizó con el test de Pearson. La asociación entre los niveles de expresión de SNAI1 y los marcadores angiogénicos se llevó a cabo mediante el test de Kruskal Wallis.

En todos los tipos de análisis se consideraron valores significativos p inferiores a 0,05 para dos colas. Todos los resultados de los análisis se derivan de 2 a 4 experimentos, cada uno llevado a cabo por duplicado.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa IBM SPSS Statistics v22.0.



RESULTADOS

RESULTADOS

1. EFECTOS PROTUMOROGÉNICOS DE LA EXPRESIÓN DE SNAI1 EN FIBROBLASTOS SOBRE LAS CÉLULAS EPITELIALES DE CÁNCER DE COLON

1.1. LA EXPRESIÓN DE SNAI1 SE ASOCIA A LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE FIBROBLASTOS ACTIVOS

Con el fin de comparar los niveles de expresión de SNAI1 de fibroblastos primarios procedentes de mucosa normal con los fibroblastos de la mucosa tumoral de pacientes con cáncer de colon, se puso a punto la técnica de aislamiento y se analizó la expresión del ARNm del factor de transcripción mediante RT-PCR.

El establecimiento de los cultivos primarios de fibroblastos normales y tumorales se llevó a cabo utilizando tejido fresco de mucosa normal y tumoral procedente de pacientes operados de CCR, como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Se caracterizaron las células como fibroblastos mediante análisis morfológico e inmunohistoquímica. Así, se comprobó que los cultivos primarios de fibroblastos asociados a tumores mantienen las propiedades fenotípicas de fibroblastos activos o miofibroblastos, ya que mostraron una morfología de huso uniforme y, además, expresión del marcador de activación α -SMA (**Figura 8 A**). Los fibroblastos se mantuvieron en cultivo durante un máximo de 7 pases, evaluándose su estado de senescencia, de manera que algunos fueron excluidos del estudio para no emplear células en senescencia replicativa (**Figura 8 B**). Igualmente, se determinó la pureza de los fibroblastos en los cultivos, testando la expresión de Vimentina y Pancitoqueratina (PanCK) por inmunofluorescencia, utilizando la línea celular de cáncer de colon LIM1215 como control (**Figura 8 C**).

Se aislaron CAFs primarios a partir del tejido tumoral de 13 pacientes con cáncer de colon, y se compararon los niveles de expresión frente a NFs aislados de la mucosa normal de colon de 5 pacientes con cáncer de colon. La expresión del ARNm de *SNAI1* se detectó en todas las muestras extraídas de CAFs de pacientes, con unos niveles de expresión relativa de entre 0,34 y 2,81. Es destacable, que los niveles de expresión del ARNm de *SNAI1* fueron mayores en los CAFs que en los fibroblastos de la mucosa normal (**Figura 9 A**).

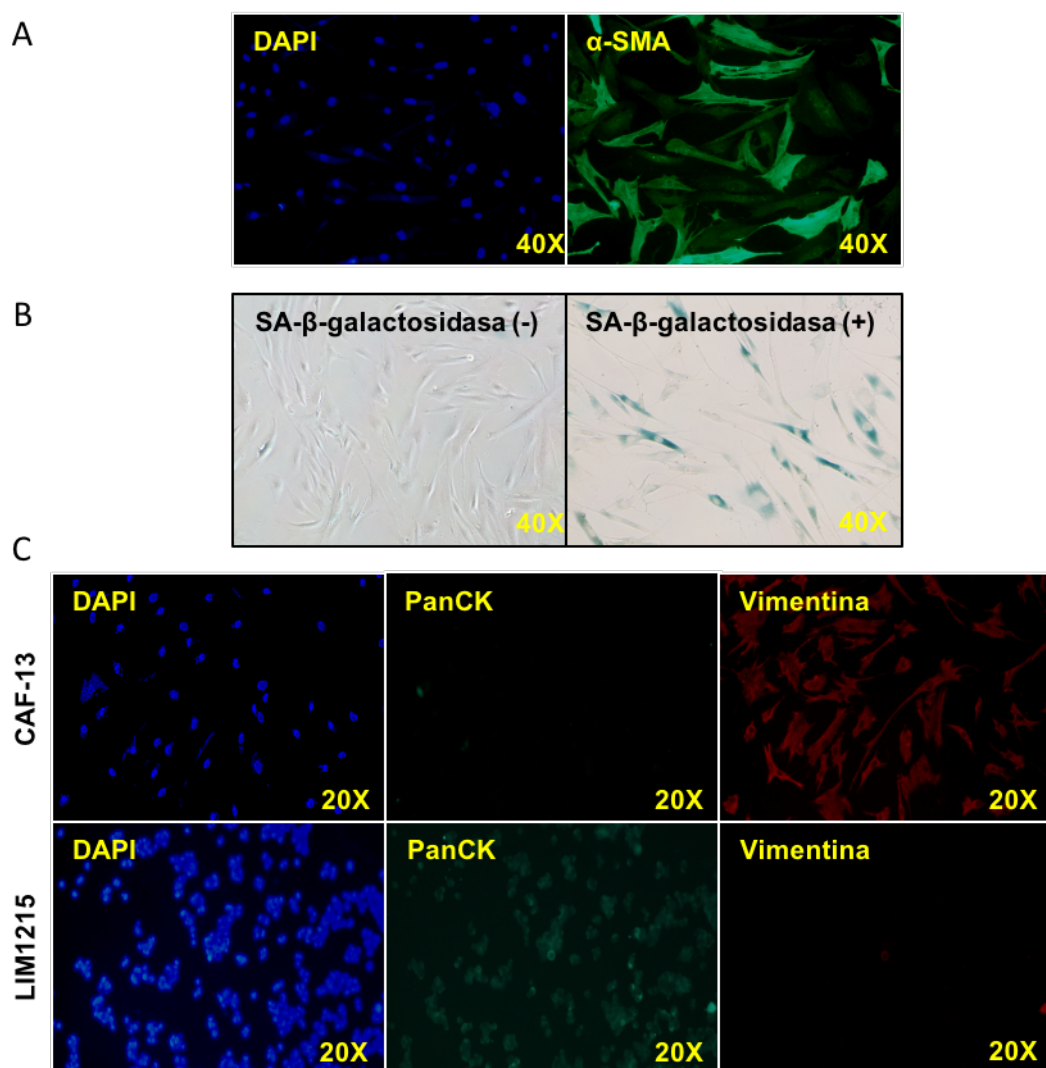


Figura 8. Establecimiento y caracterización de cultivos primarios de CAFs de pacientes con CC. (A) Imágenes representativas por inmunofluorescencia del marcaje de α -SMA como marcador de fibroblasto activado, y DAPI como marcador de núcleos. (B) Imágenes representativas del marcaje de la actividad β -galactosidasa para evaluar el grado de senescencia de los cultivos primarios de CAFs (cultivo de CAFs negativo y cultivo positivo para el marcaje de β -galactosidasa). (C) Imágenes representativas de marcadores de fibroblastos (Vimentina), marcadores epiteliales (Pancitoqueratina) y marcadores nucleares (DAPI) de un cultivo primario de CAF (arriba) y células epiteliales LIM1215 como control. PanCK: Pancitoqueratina

Estos datos en los que se revela un aumento significativo en la expresión de *SNAI1* en CAFs respecto a NFs, sugieren que *SNAI1* podría ser considerado un marcador de fibroblasto activado. Como control se utilizó α -SMA, un gen ampliamente estudiado como marcador fibroblasto activado (Räsänen y Vaheri, 2010), que también se encontró sobreexpresado en CAFs, en comparación con los NFs (Figura 9 A). A la vista de estos datos, se estudió la asociación, mediante RT-PCR, entre la expresión de *SNAI1* y algunos marcadores clásicos de CAFs en muestras de mucosa normal y tumoral de 50 pacientes con cáncer de colon. Como se muestra en las gráficas de la **Figura 9 B**, la expresión de *SNAI1* se asoció de forma estadísticamente significativa con la expresión de los marcadores α -SMA y *FAP*, no encontrándose correlación estadísticamente significativa con *FSP-1*.

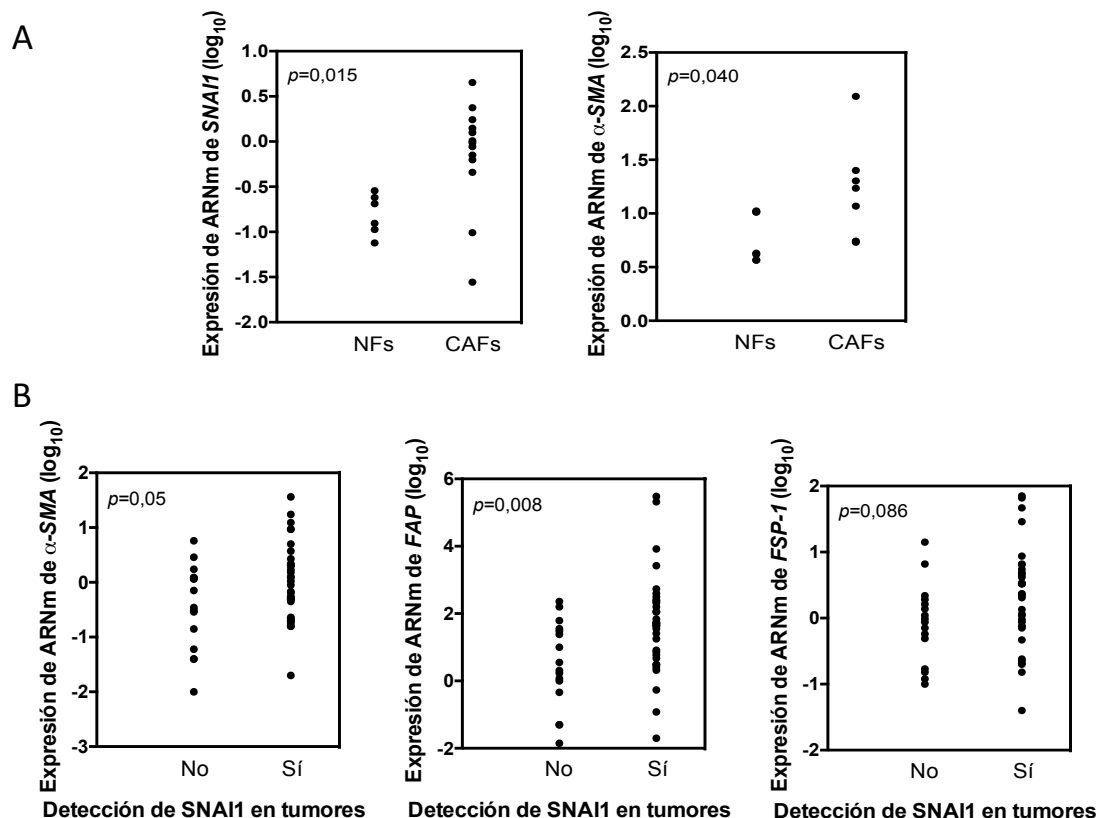


Figura 9. La expresión de *SNAI1* se asocia con la expresión de marcadores de fibroblastos activos. **(A)** Niveles de expresión del ARNm de *SNAI1* en NFs y CAFs. **(B)** Asociación entre los niveles de expresión de ARNm de marcadores de fibroblastos activos α -SMA, *FAP* y *FSP-1*; y la expresión de *SNAI1* por PCR en muestras de pacientes con cáncer de colon.

Además, el análisis por inmunohistoquímica de *SNAI1*, α -SMA y *FAP* en muestras humanas de tumores de colon reveló un patrón de marcaje similar de los tres marcadores, con una expresión localizada fundamentalmente en el estroma del tumor (**Figura 10**).

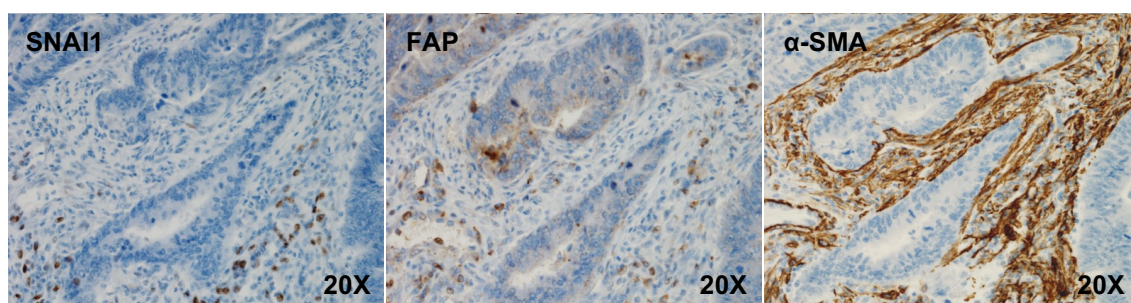


Figura 10. La expresión de *SNAI1*, *FAP* y α -SMA muestra un patrón de expresión similar en muestras de pacientes con cáncer de colon.

1.2. LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON ES ESTIMULADA POR LA SEÑALIZACIÓN PARACRINA DERIVADA DE LA EXPRESIÓN DE *SNAI1* EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CAFs HUMANOS

Para evaluar si la expresión de *SNAI1* estimula la migración de células de cáncer de colon de forma paracrina, se llevaron a cabo una serie de experimentos de migración en co-cultivo con separación física utilizando el sistema de insertos tipo “Transwell”. Así, se sembraron en el inserto inferior CAFs primarios procedentes de 13 pacientes con cáncer de colon como células “donadoras” en co-cultivo con dos líneas de cáncer de colon sembradas en el inserto superior, SW480-ADH y LIM1215, como células migratorias o “aceptoras”.

Todos los CAFs co-cultivados con la línea celular LIM1215 estimularon en gran medida la migración de línea celular de cáncer de colon, en comparación con los cultivos usados como control donde se cultivaron las células LIM1215 de forma aislada en el inserto superior. Sin embargo, dos líneas de CAFs primarios mostraron un efecto moderado sobre la migración y, por tanto, fueron excluidos del estudio para evitar interpretaciones erróneas (datos no mostrados).

Cabe destacar que el análisis estadístico de los niveles de expresión del ARNm de *SNAI1* en CAFs reveló una correlación directa con la habilidad para inducir la migración de células de cáncer de colon de manera paracrina (**Figura 11 A**). La correlación entre los niveles de expresión de ARNm de *SNAI1* en CAFs, y su habilidad para inducir la migración de células de cáncer de colon se validó además con CAFs elegidos al azar procedentes de 4 pacientes y la línea celular SW480-ADH. Así, se observaron resultados en la misma línea de los observados previamente con las células de la línea LIM1215 (**Figura 11 B**).

En conjunto, estos datos y los comentados previamente en relación a los niveles elevados de expresión de *SNAI1* en CAFs respecto a NFs, demuestran que la sobreexpresión de *SNAI1* en el estroma tumoral se relaciona con un incremento en la migración de las células de cáncer de colon.

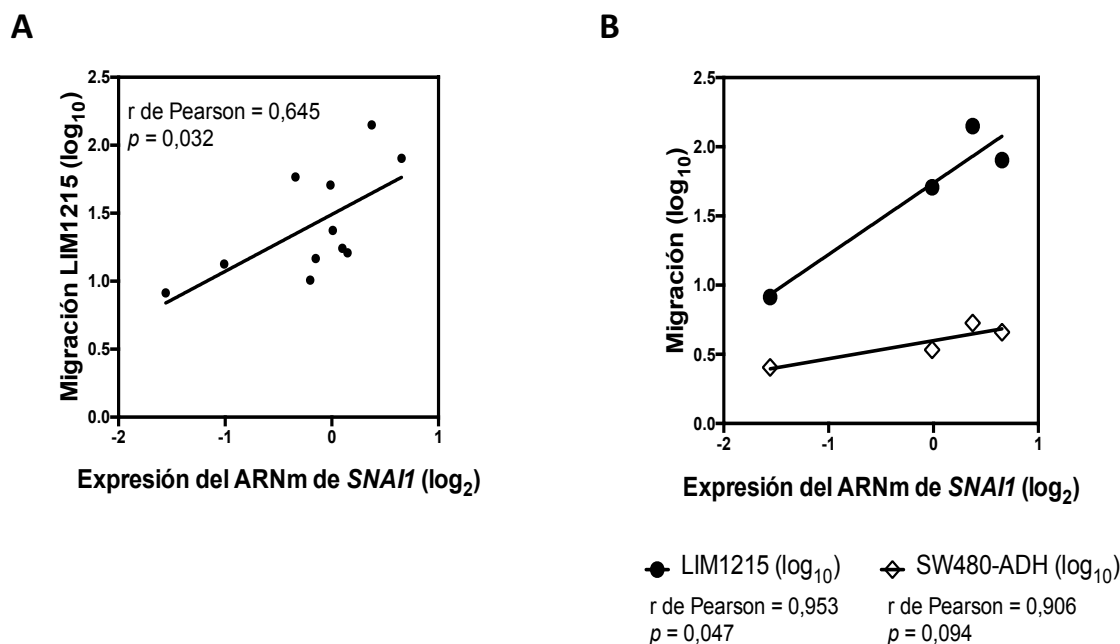


Figura 11. La migración de las células de cáncer de colon es estimulada por la señalización paracrina derivada de la expresión de *SNAI1* en CAFs primarios humanos. **(A)** Correlación de la capacidad de migración de las células de cáncer de colon LIM1215 en co-cultivo durante 48 horas con CAFs de pacientes con los distintos niveles de expresión de *SNAI1*. **(B)** Correlación de la capacidad de migración de las células de cáncer de colon LIM1215 y SW480-ADH en co-cultivo con CAFs procedentes de 4 pacientes elegidos al azar y con distintos niveles de expresión de *SNAI1*.

1.3. *SNAI1* AUMENTA LA CAPACIDAD DE LAS CÉLULAS PARA INDUCIR LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON DE FORMA PARACRINA

Para validar el resultado anterior, se llevaron a cabo una serie de experimentos en co-cultivo utilizando células con sobreexpresión ectópica de *Snai1* como “donadoras”. En el primer grupo de experimentos se usaron 3 líneas celulares de cáncer de colon o “aceptoras” (SW480-ADH, HT-29 y LIM1215) en presencia de un panel de líneas celulares de cáncer de colon y fibroblastos expresando *Snai1* de forma exógena o “donadoras” (SW480-ADH, HT-29 and 1.BR3.G). La expresión ectópica de *Snai1*, tanto en la línea SW480-ADH (**Figura 12 A**) como en la línea HT-29 (**Figura 12 B**), estimuló un incremento estadísticamente significativo en la migración de las células SW480-ADH salvajes en co-cultivo. Por otra parte, la sobreexpresión de *Snai1* en fibroblastos humanos inmortalizados 1.BR3.G, estimuló la migración de las células SW480-ADH salvajes en co-cultivo de forma más notable, en comparación con la migración inducida por células tumorales con sobreexpresión del factor de transcripción (**Figura 12 C**). De igual forma, la inducción de la migración también se observó cuando el co-cultivo se realizó con la línea celular LIM1215 como “aceptora” (**Figura 12 D**).

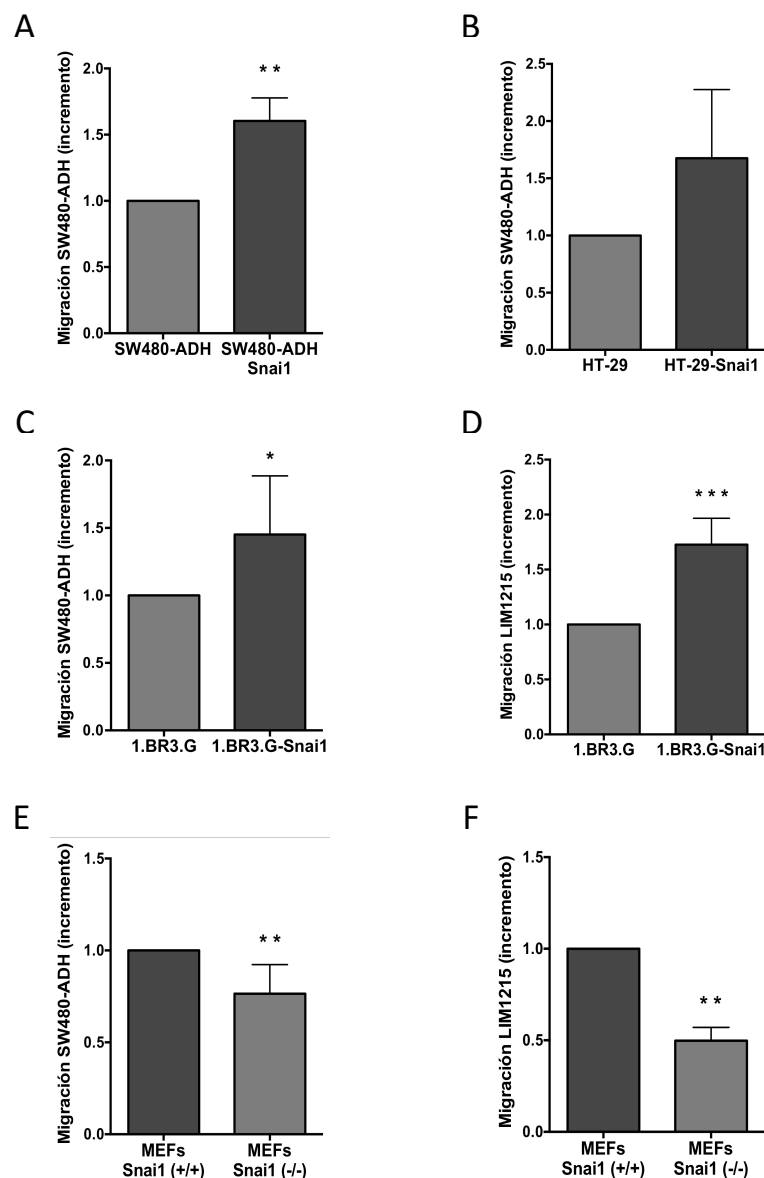


Figura 12. SNAI1 aumenta la capacidad de las células para inducir la migración de células de cáncer de colon de forma paracrina. (A) Migración de las células de cáncer de colon SW480-ADH en co-cultivo durante 48 horas con células de cáncer de colon SW480-ADH sobreexpresando Snai1 de forma ectópica. (B) Migración de las células de cáncer de colon SW480-ADH en co-cultivo durante 48 horas con células de cáncer de colon HT-29 sobreexpresando Snai1 de forma ectópica. (C) Migración de las células de cáncer de colon SW480-ADH en co-cultivo durante 48 horas con fibroblastos 1.BR3.G sobreexpresando Snai1 de forma ectópica. (D) Migración de las células de cáncer de colon LIM1215 en co-cultivo durante 48 horas con fibroblastos 1.BR3.G sobreexpresando Snai1 de forma ectópica. (E) Migración de las células de cáncer de colon SW480-ADH en co-cultivo durante 48 horas con fibroblastos MEFs Snai1 (-/-). (F) Migración de las células de cáncer de colon LIM1215 en co-cultivo durante 48 horas con fibroblastos MEFs Snai1 (-/-). * P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

En una segunda aproximación, se analizó el efecto de la pérdida de función de Snai1 en fibroblastos MEFs sobre la capacidad migratoria de las células de cáncer de colon (SW480-ADH o LIM1215) en co-cultivo. Como se muestra en la **Figura 12 E y F**, la migración de las células SW480-

ADH y LIM1215 se vio disminuida de forma estadísticamente significativa cuando estas se co-cultivaron con fibroblastos MEFs Snai1 (-/-), en comparación con los MEFs Snai1 (+/+).

Estos experimentos demuestran, por tanto, los efectos pro-migratorios dependientes de la expresión de SNAI1 sobre células epiteliales de cáncer de colon de forma paracrina.

1.4. SNAI1 AUMENTA LA CAPACIDAD DE LAS CÉLULAS PARA INDUCIR PROLIFERACIÓN EN CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON DE FORMA PARACRINA

Para comprobar si la expresión de SNAI1 en distintos tipos celulares también estimula la proliferación de células de cáncer de colon de una forma paracrina, se realizaron distintos experimentos. Igual que en los experimentos realizados para estudiar la migración, las células se co-cultivaron usando el sistema “transwell”, en esta ocasión con insertos de poro de 0,4 μm , impidiendo así la migración de las células del compartimento superior y el contacto físico entre ambos tipos celulares.

Tanto las células epiteliales SW480-ADH (**Figura 13 A**) como los fibroblastos 1.BR3.G (**Figura 13 B**) con sobreexpresión ectópica de Snai1 estimulaban la proliferación de las células epiteliales de cáncer de colon salvajes SW480-ADH, en comparación con las células transfectadas con el vector vacío. Sin embargo, el efecto en la tasa de proliferación era notablemente mayor cuando Snai1 era sobreexpresado en fibroblastos.

Para validar el resultado anterior, las células de la línea de cáncer de colon SW480-ADH se incubaron con medio condicionado de fibroblastos 1.BR3.G sobreexpresando Snai1 de forma ectópica y se analizaron las fases del ciclo celular por citometría de flujo. La incubación con medio procedente de los 1.BR3.G-Snai1 estimuló la entrada de las células SW480-ADH en fase S y M en mayor medida que el medio condicionado de los fibroblastos control (**Figura 13 C**).

Como previamente se observó en el estudio del efecto pro-migratorio, el efecto paracrinico de la expresión de Snai1 sobre la proliferación de las células tumorales de cáncer de colon fue significativamente mayor cuando éste era expresado en fibroblastos, en comparación con los resultados obtenidos en células epiteliales expresando el gen.

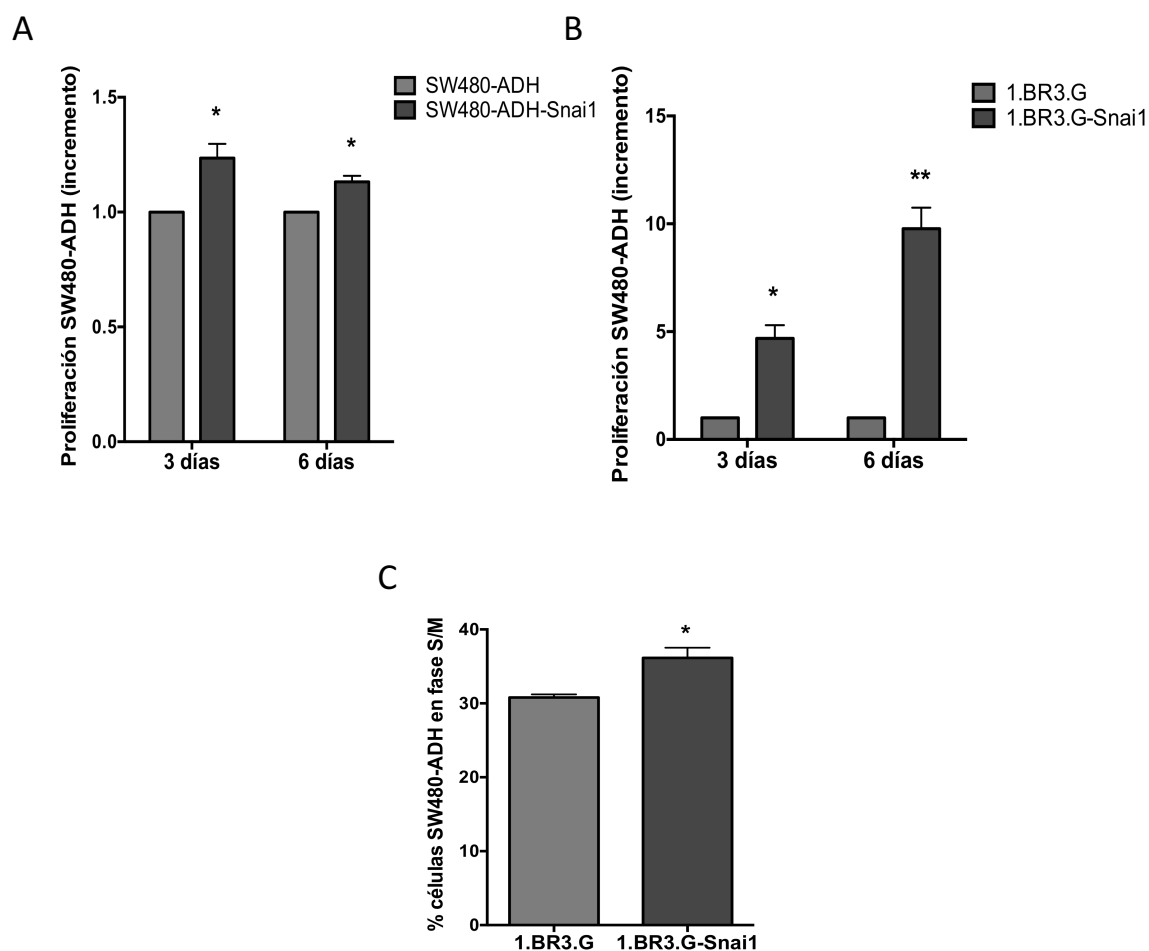


Figura 13. SNAI1 aumenta la capacidad de las células para inducir la proliferación de células de cáncer de colon de forma paracrina. (A) Proliferación de las células de cáncer de colon SW480-ADH en cultivo durante 3 y 6 días con medio condicionado de células de cáncer de colon SW480-ADH sobre-expresando Snai1 de forma ectópica. **(B)** Proliferación de las células de cáncer de colon SW480-ADH en cultivo durante 3 y 6 días con medio condicionado de fibroblastos 1.BR3.G sobre-expresando Snai1 de forma ectópica. **(C)** Porcentaje de células SW480-ADH en fase S/M cuando se incubaron durante 24 horas con medio condicionado de fibroblastos 1.BR3.G-Snai1. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

1.5. LA EXPRESIÓN DE SNAI1 EN FIBROBLASTOS O CAFs PRIMARIOS FAVORECE LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR EN CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON DE FORMA PARACRINA

Para investigar si SNAI1 induce progresión del ciclo celular a favor del aumento de proliferación, las células SW480-ADH se incubaron con medio condicionado de CAFs primarios con diferentes niveles de expresión del ARNm de *SNAI1*, procedentes de 9 pacientes, y se analizaron de nuevo las fases del ciclo celular por citometría de flujo. El resultado fue una correlación directa, que resultó estadísticamente significativa, entre los niveles de ARNm de *SNAI1* de los CAFs y el porcentaje de células SW480-ADH en división o en fase S/M del ciclo celular (**Figura 14**).

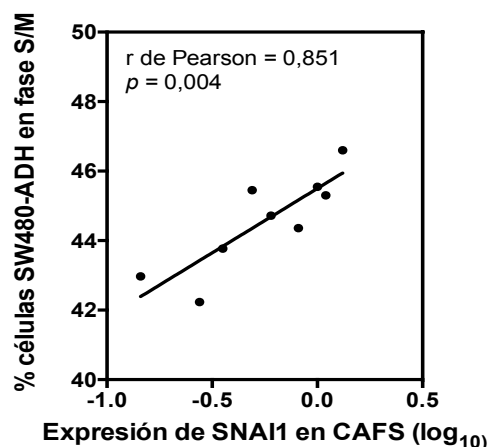


Figura 14. La expresión de *SNAI1* en fibroblastos o CAFs favorece la progresión del ciclo celular en células con cáncer de colon de forma paracrina. Asociación del porcentaje de células SW480-ADH en fase S/M cuando se incubaron durante 24 horas con medio condicionado de CAFs con distintos niveles de expresión de *SNAI1*.

1.6. SNAI1 FAVORECE EL CRECIMIENTO Y LA INVASIÓN TUMORAL EN XENOTRANSPLANTES DE CÁNCER DE COLON EN MODELOS *IN VIVO* EN RATONES DESNUDOS

El significado *in vivo* de los resultados anteriores se exploró también en modelos de ratón con xenotransplantes tumorales. Así, células de cáncer de colon HT-29 fueron inoculadas, de manera subcutánea, en los flancos de 6 ratones siguiendo tres grupos de tratamiento: células HT-29 como grupo control, células HT-29 junto con fibroblastos MEFs Snai1 (+/+), y HT-29 con MEFs Snai1 (-/-). Como se muestra en la **Figura 15 A**, los tumores del grupo control y aquellos derivados de la co-inyección de células tumorales con MEFs Snai1 (-/-) presentaron un volumen significativamente menor que el grupo derivado de la co-inyección de células HT-29 con MEFs Snai1 (+/+). Apoyando estos datos, la tinción con el anticuerpo Ki67 mostró un descenso significativo en la tasa de proliferación en tumores con MEFs Snai1 (-/-), respecto a tumores control y con MEFs Snai1 (+/+) (**Figura 15 B**). Además, como cabía esperar, la tinción por inmunohistoquímica reveló una menor expresión de Snai1 en el compartimento estromal en tumores derivados de la co-inyección de HT-29/MEFs Snai1 (-/-), en comparación con aquellos generados a partir de la co-inyección con HT-29/MEFs Snai1 (+/+) y con los derivados de la inyección de células HT-29 de forma aislada (**Figura 15 C**).

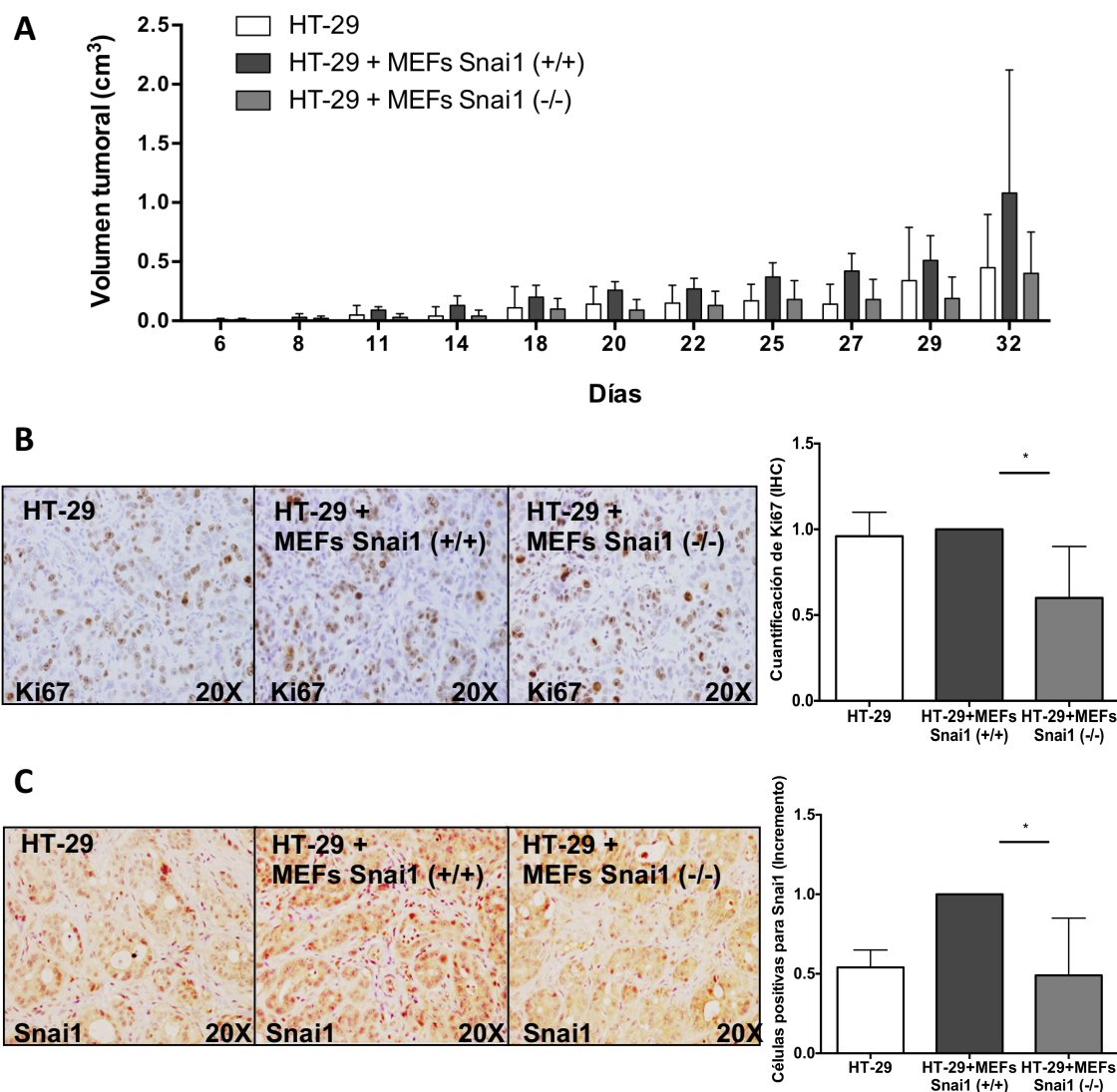


Figura 15. La expresión de Snai1 en los fibroblastos es necesaria para el efecto co-adyuvante de estas células sobre la proliferación de las células tumorales en xenotransplantes de cáncer de colon en ratones desnudos. **(A)** Representación del volumen tumoral (cm³) monitorizado durante 32 días generados a partir de la co-inyección de células de cáncer de colon HT-29 solas (grupo control), HT-29 con fibroblastos MEFs Snai1 (+/+), y HT-29 con fibroblastos MEFs Snai1 (-/-). **(B)** Imágenes representativas (izquierda) y cuantificación (derecha) del marcador de proliferación Ki67 en los distintos grupos de ensayo. **(C)** Imágenes representativas (izquierda) y cuantificación (derecha) de Snai1 en los distintos grupos de ensayo. * P<0.05.

Sorprendentemente, también se pudo observar invasión de las células del tumor subcutáneo hacia la capa muscular subyacente en el 67% de los tumores derivados de la co-inyección de HT29/MEFs Snai1 (+/+) (**Figura 16 A**), al contrario que los tumores con HT-29/MEFs Snai1 (-/-) en los que en ningún caso se observó invasión alguna del tumor hacia la capa muscular. Apoyando estos datos, se vio una regulación negativa de E-Cadherina (CDH1) por IHC en tumores derivados de células de cáncer de colon con fibroblastos Snai1 (+/+) (**Figura 16 B**).

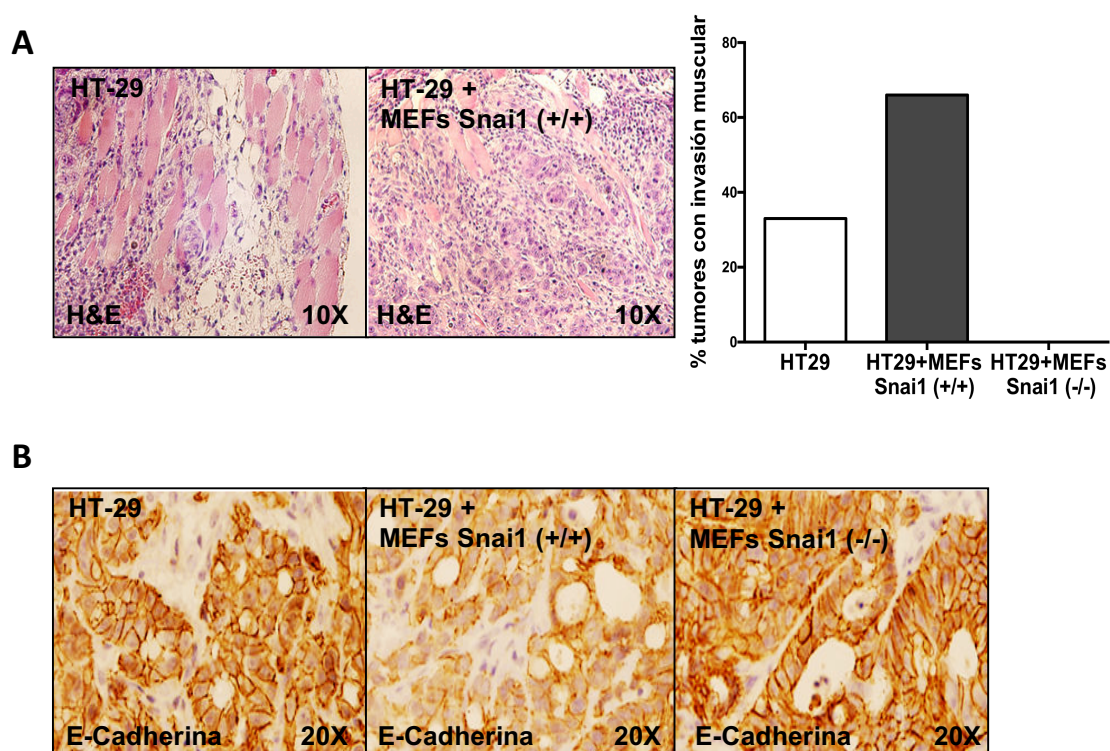


Figura 16. La expresión de Snai1 en fibroblastos es necesaria para el efecto co-adyuvante de estas células sobre la invasión de las células tumorales en xenotransplantes de cáncer de colon en ratones desnudos. **(A)** Imágenes representativas (izquierda) y cuantificación (derecha) de la invasión muscular de las células tumorales en los distintos grupos de ensayo. **(B)** Imágenes representativas del marcador de EMT E-Cadherina en los distintos grupos de ensayo. H&E: Hematoxilina-Eosina

En conjunto, estos datos demuestran que la depleción de Snai1 en fibroblastos retrasa el crecimiento tumoral e inhibe la capacidad invasiva de las células tumorales adyacentes, confirmando así los resultados *in vitro* previamente observados sobre el efecto paracrino de la expresión de *SNAI1* en fibroblastos.

1.7. REGULACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE CITOQUINAS MEDIADO POR LA EXPRESIÓN DE SNAI1 EN FIBROBLASTOS

Con el objetivo de identificar los mediadores paracrinos implicados en la señalización entre los fibroblastos y las células de cáncer de colon, se investigó si la expresión de SNAI1 en los fibroblastos daba lugar a cambios en el patrón de liberación de citoquinas, factores de crecimiento, y otros inmunomoduladores. Así, se realizó un array para analizar la expresión de 80 citoquinas liberadas en el medio condicionado de fibroblastos 1.BR3.G transfectados de forma transitoria con Snai1 o con el vector vacío, 1.BR3.G-pcDNA3.1 como control. Las intensidades relativas de fluorescencia de las citoquinas se normalizaron en relación a los puntos control dentro de la misma membrana. Se observaron diferencias en la concentración de algunas citoquinas en el medio

condicionado de los fibroblastos 1.BR3.G-Snai1 en comparación con los medios de los fibroblastos control (Tabla VI).

CITOQUINA	Media de niveles relativos		Desviación estándar	Valor <i>p</i>
	1.BR3.G-Snai1/1.BR3.G			
CXCL1 (GRO-α)	1,31	0,38	0,073	
CCL7 (MCP-3)	1,20	0,24	0,074	
CX3CL1 (Fractalquina)	1,17	0,08	< 0,001	
CCL1 (I-309)	1,17	0,20	0,064	
IL-10	0,92	0,10	0,079	
G-CSF	0,78	0,21	0,026	

Tabla VI. Proteínas desreguladas en el medio condicionado de fibroblastos 1.BR3.G transfectados con Snai1 respecto a los fibroblastos control. Los niveles relativos de las citoquinas fueron calculados dividiendo las medias de los 4 arrays de citoquinas de cada grupo, 1.BR3.G-Snai1 y control, de manera que los valores superiores a 1 indican sobreexpresión y los valores por debajo de la unidad indican regulación negativa de las citoquinas. Para la validación se tuvieron en cuenta aquellas citoquinas desreguladas con un valor *p*<0,1.

En conjunto, estos datos parecen indicar que la expresión de SNAI1 en fibroblastos favorece la migración y la proliferación de células de cáncer de colon, mediante la modulación del perfil de expresión de ciertas citoquinas.

Por tanto, para verificar el efecto de las mismas, las células SW480-ADH se incubaron con las correspondientes proteínas recombinantes. La migración de las células aumentó de forma estadísticamente significativa cuando se incubaron con las proteínas Fractalquina o MCP-3. De igual forma, aunque no resultó estadísticamente significativo, se observó un incremento en la migración con las citoquinas I-309 y GRO-α (Figura 17).

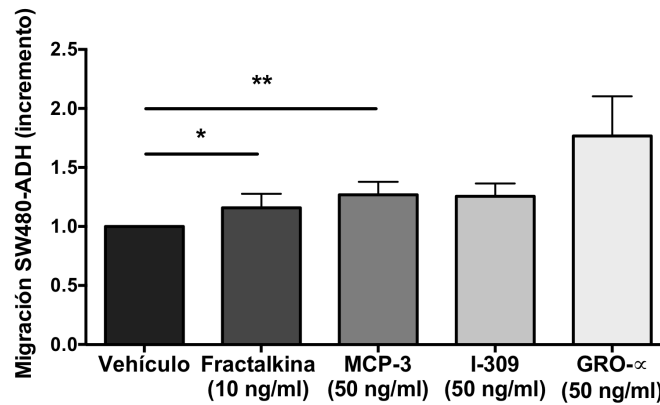


Figura 17. Las proteínas recombinantes Fractalkina y MCP-3 inducen la migración de células de cáncer de colon de forma estadísticamente significativa. Migración de las células de cáncer de colon SW480-ADH en cultivo durante 48 horas con distintas concentraciones de las proteínas recombinantes sobre-expresadas en el array. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Mediante diferentes aproximaciones observamos que, a pesar de que todas las citoquinas sobreexpresadas en el array estimulaban la migración en mayor o menor medida, sólo una de ellas (MCP-3) se asociaba a los niveles de expresión de SNAI1. Por un lado, se utilizaron fibroblastos con sobreexpresión de Snai1 (**Figura 18 A**) y, fibroblastos MEFs Snai1 (+/+) o (-/-) tratados con TGF- β para estimular los niveles de Snai1 (**Figura 18 B**). Además, se usaron diferentes muestras humanas, entre las que se incluyen, CAFs de 8 pacientes (**Figura 18 C**) y tejido tumoral total de 65 pacientes con cáncer de colon (**Figura 18 D**), donde se estudió la asociación de los niveles de expresión de SNAI1 y MCP-3. Cabe destacar que, en todas las aproximaciones llevadas a cabo, los niveles de expresión de SNAI1 se asociaron de forma directa y estadísticamente significativa con los niveles de expresión de MCP-3. El resto de las citoquinas, como GRO- α y Fractalkina, también mostraron asociación estadística con los niveles de SNAI1 en alguna de las aproximaciones, pero no en todas (datos no mostrados).

Por tanto, el conjunto de estos datos indican que MCP-3 es un mediador dependiente de la expresión de SNAI1 que estimula la migración de células tumorales de colon cuando es liberada al medio.

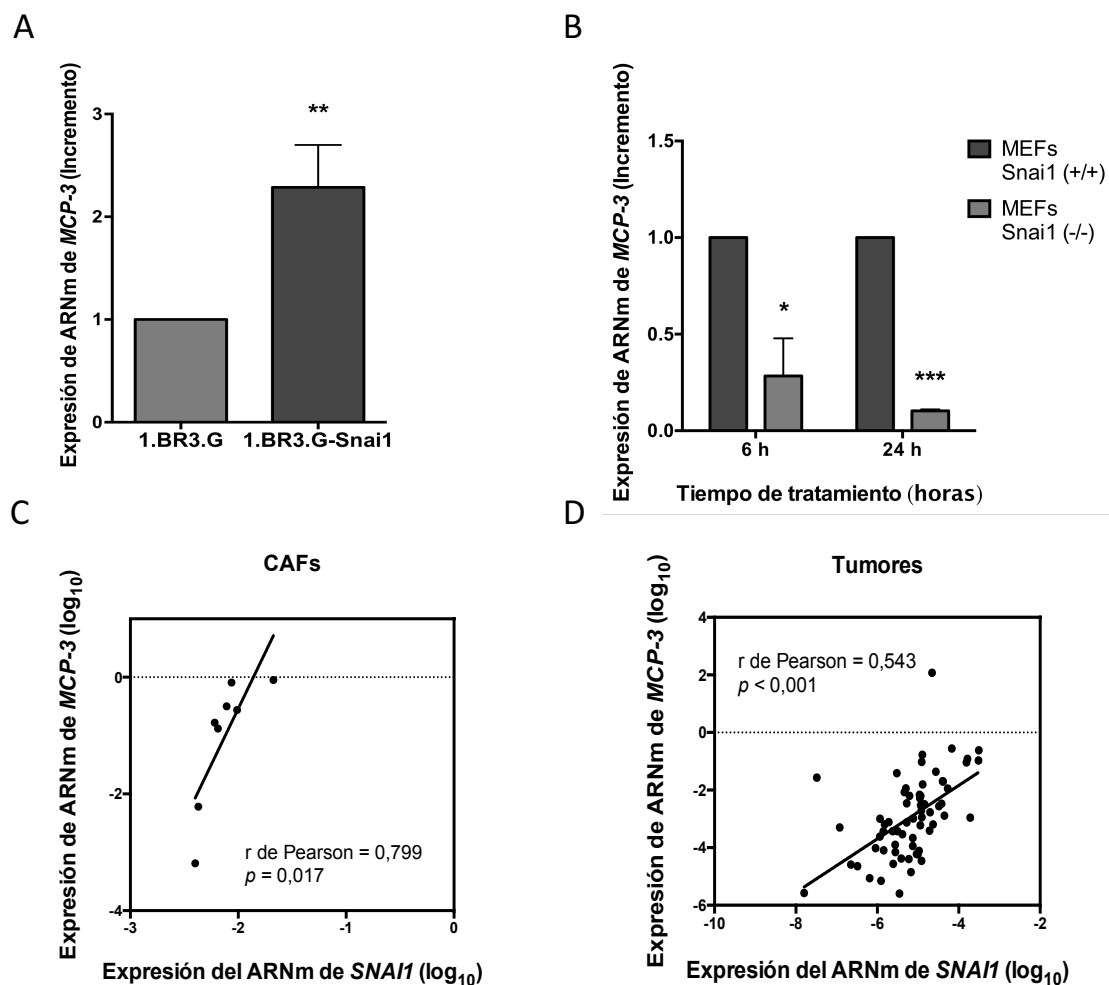


Figura 18. Los niveles de expresión del gen MCP-3 se asocian de forma positiva con los niveles de expresión de SNAI1. (A) Niveles relativos del ARNm de MCP-3 en fibroblastos 1.BR3.G con sobre-expresión de *Snai1* de forma ectópica. **(B)** Niveles relativos del ARNm de MCP-3 en fibroblastos MEFs con *Snai1* deleciónado. **(C)** Correlación entre los niveles de expresión de MCP-3 y *SNAI1* en CAFs procedentes de 8 pacientes. **(D)** Correlación entre los niveles de expresión de MCP-3 y *SNAI1* en tejido tumoral de 65 pacientes con cáncer de colon. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

2. LA EXPRESIÓN DE SNAI1 EN FIBROBLASTOS ACTIVOS PROMUEVE CAMBIOS EN LA MATRIZ EXTRACELULAR QUE CONTROLAN LA ANGIOGÉNESIS DEL TUMOR

2.1. PDGF-BB ESTIMULA EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE MATRIZ EXTRACELULAR POR LOS FIBROBLASTOS

Con el objetivo de estudiar el papel de PDGF-BB en la activación de los fibroblastos y la relevancia de éstos sobre la arquitectura de la matriz extracelular, los fibroblastos BJ-hTERT se trataron con el factor de crecimiento, y con ácido ascórbico para estimular la producción de matriz extracelular *in vitro*, de acuerdo con el protocolo de generación de matrices extracelulares derivadas de fibroblastos (Castelló-Cros y Cukierman, 2009). Tras el tratamiento con PDGF-BB en los fibroblastos, se pudo observar un crecimiento celular en multicapa y un patrón de alineamiento paralelo, en comparación con los fibroblastos no tratados, que revelaron un crecimiento en monocapa y una organización aleatoria (**Figura 19**). En los histogramas de direccionalidad se puede observar un mayor número de fibroblastos agrupados en torno a ángulos similares cuando estos eran tratados con PDGF-BB, al contrario que los fibroblastos no tratados donde la distribución era homogénea en torno a distintos ángulos.

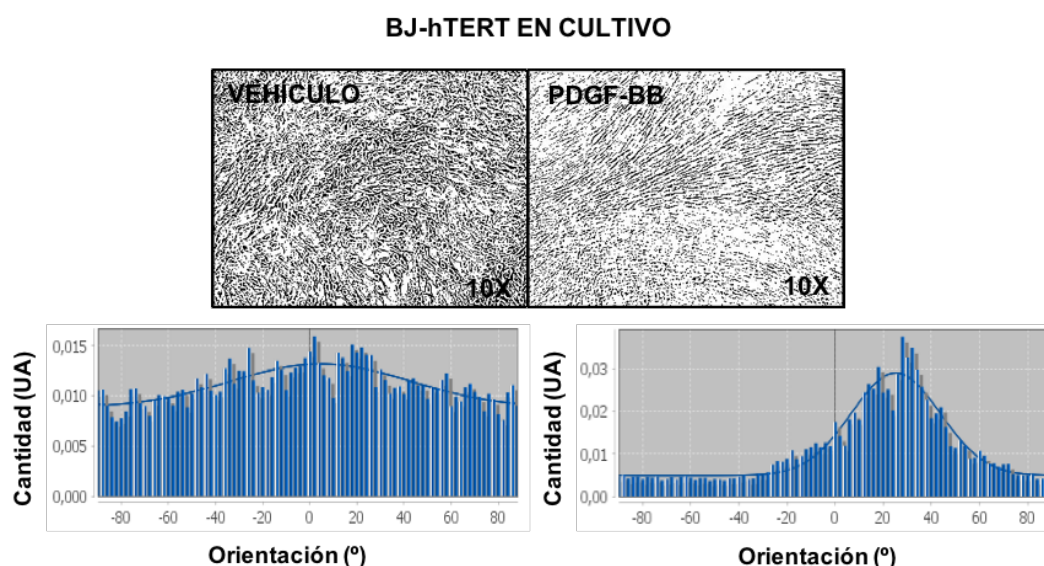


Figura 19. PDGF-BB estimula la organización de los fibroblastos BJ-hTERT y su crecimiento en multicapa. Imágenes en binario representativas de la orientación celular de los fibroblastos BJ-hTERT tratados o no con PDGF-BB (20 ng/ml), según se indica (arriba), y los histogramas de direccionalidad (abajo), calculados con el programa ImageJ representando la frecuencia de distribución de ángulos de las células (centrados en el ángulo 0°).

Tras la generación de la matriz extracelular 3-D, los fibroblastos se lisaron con un detergente y las fibras de la matriz se marcaron con anticuerpos para Colágeno I y FN1 con el fin de estudiar la composición y cambios estructurales de la matriz. El grosor de la matriz se vio incrementado en aquellas matrices derivadas de fibroblastos tratados con PDGF-BB (**Figura 20 A**). Además, la deposición de Colágeno I y FN1 se vio incrementada también en estas matrices (**Figura 20 B**).

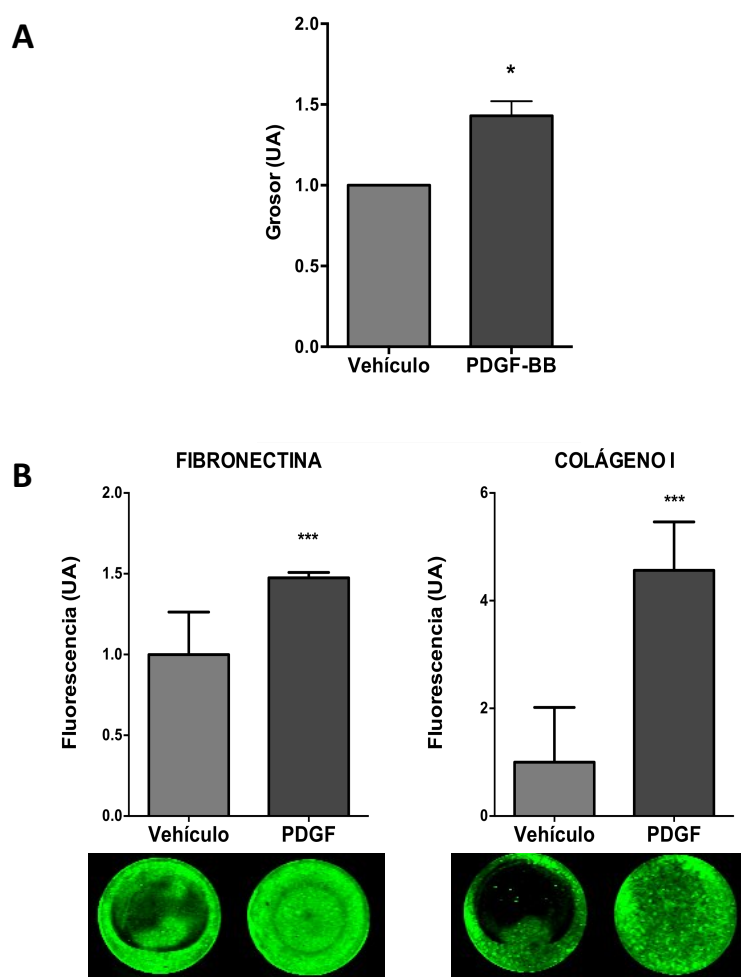
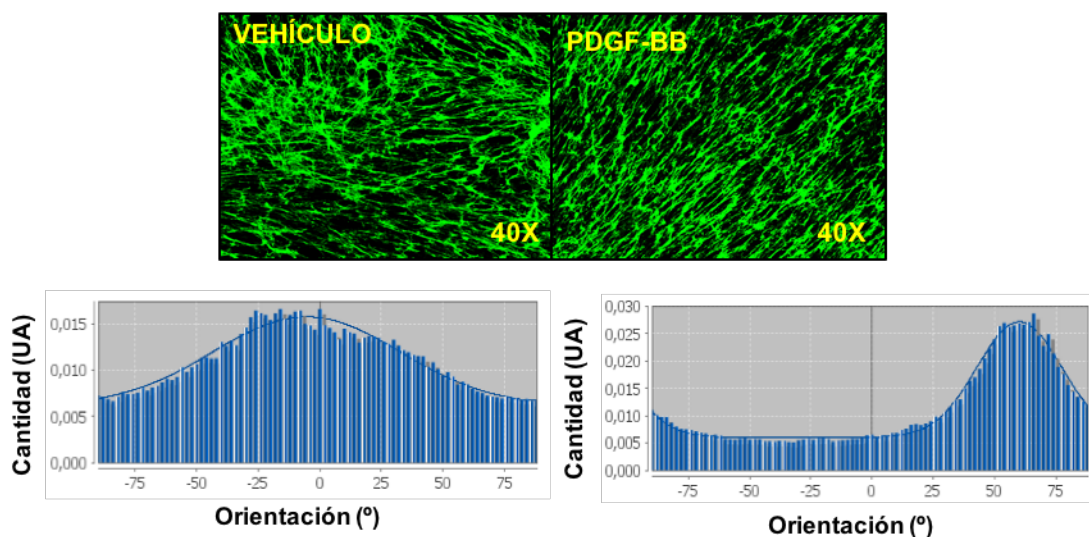


Figura 20. PDGF-BB estimula en fibroblastos BJ-hTERT la deposición de matriz extracelular. (A) Grosor de la MEC en fibroblastos BJ-hTERT tratados o no con PDGF-BB (20 ng/ml), según se indica. **(B)** Deposición de FN1 y Colágeno I en matrices 3D generadas por fibroblastos BJ-hTERT tratados o no con PDGF-BB, según se indica. Imágenes representativas realizadas mediante inmunofluorescencia de las matrices 3D, reveladas y cuantificadas por densitometría usando el equipo Odyssey Infrared Imaging System (Li-COR Biosciences) y una compensación de foco de 3 mm. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

Por otra parte, lo más llamativo fue que se pudo observar un patrón de fibras tanto de Colágeno I como de FN1 que revelaban un mayor paralelismo y ordenación en el caso de las matrices procedentes de fibroblastos estimulados con PDGF-BB, respecto a aquellos que no fueron tratados (**Figura 21**), como se puede observar de nuevo en los histogramas de direccionalidad.

FIBRONECTINA



COLÁGENO I

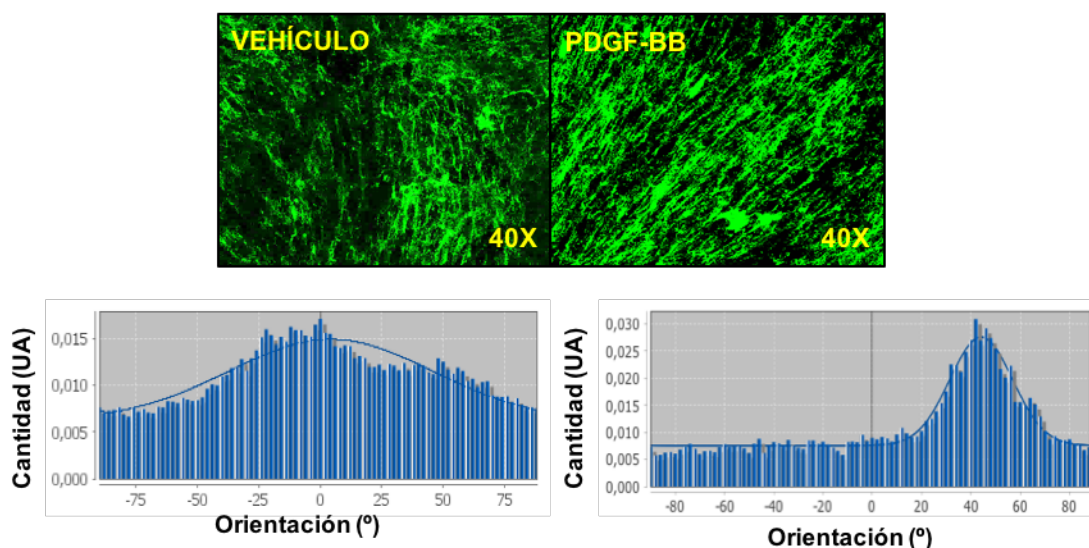


Figura 21. PDGF-BB estimula el modelado de la MEC generada por fibroblastos BJ-hTERT. Imágenes representativas de FN1 y Colágeno I realizadas mediante inmunofluorescencia de las matrices 3D generadas por fibroblastos BJ-hTERT tratados o no con PDGF-BB (20 ng/ml), según se indica. Debajo de las imágenes se muestran los histogramas de direccionalidad calculados con el programa ImageJ representando la frecuencia de distribución de ángulos de las fibras (centrados en el ángulo 0°).

2.2. LAS MATRICES DERIVADAS DE FIBROBLASTOS TRATADOS CON PDGF-BB ESTIMULAN LA ACTIVACIÓN Y TUBULOGÉNESIS DE LAS CÉLULAS HUVECS

Para estudiar el efecto de la ordenación de la MEC en la morfogénesis de las células endoteliales HUVECs, las células se sembraron sobre las matrices 3D de fibroblastos activados con PDGF-BB. Previamente, se comprobó la ausencia de respuesta directa de las células HUVECs al tratamiento con el factor PDGF-BB, para poder analizar exclusivamente el efecto de la MEC sobre

las mismas. Para ello, las células endoteliales humanas (HUVECs) fueron caracterizadas en base a la expresión del receptor de PDGF-BB (PDGFR-β). Como muestra la **Figura 22**, no se observó expresión del receptor sin fosforilar en este tipo celular. En paralelo, las células tampoco mostraron fosforilación del mismo tras la adición de PDGF-BB exógeno. Además, también se confirmó la no expresión del receptor tras el co-cultivo de estas células con fibroblastos BJ-hTERT o MEFs durante 48 horas mediante sistema de insertos con separación física.

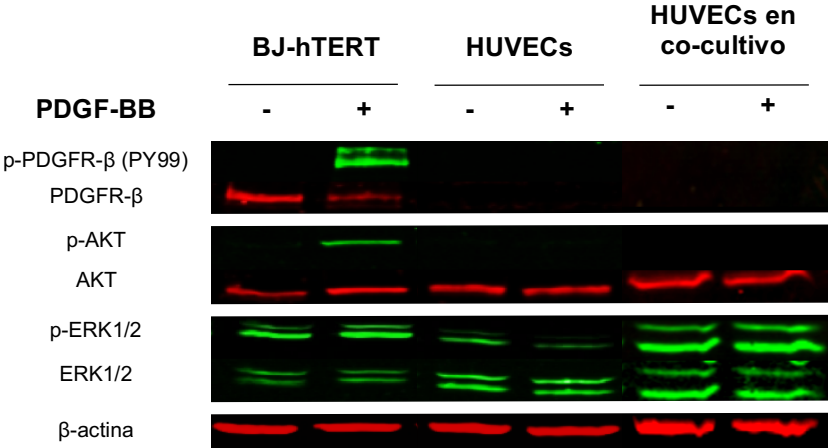


Figura 22. Las células HUVECs no presentan expresión de PDGFR-β. Inmunotransferencia de p-PDGFR-β (PY99), PDGFR-β, p-Akt, Akt, p-ERK1/2, ERK1/2 y de β-actina (control de carga) de fibroblastos BJ-hTERT, HUVECs y co-cultivo de 48 h de ambos tipos celulares tratados o no con PDGF-BB (20 ng/ml), según se indica.

Tras comprobar la ausencia de respuesta al factor de crecimiento de fibroblastos, las células HUVECs se sembraron sobre matrices 3D derivadas de fibroblastos tratados o sin tratar con PDGF-BB. Curiosamente, las células HUVECs sembradas durante 16 horas en ausencia de FBS sobre las matrices derivadas de fibroblastos tratados con PDGF-BB, dieron lugar a estructuras tubulares similares a capilares y cordones de células en anastomosis que no fueron observadas con las células HUVECs sembradas en matrices de fibroblastos no tratados (**Figura 23, izquierda**).

Las estructuras observadas en las células endoteliales son sugerentes de un proceso de activación de estas células. Apoyando estos resultados, observamos que la expresión de los marcadores clásicos relacionados con la angiogénesis o activación de células endoteliales, como fosfo-ERK1/2, VE-Cadherina y MMP-9, estaban incrementados en células HUVECs sembradas durante 16 horas en matrices 3D derivadas de fibroblastos tratados con PDGF-BB, en comparación con las sembradas en matrices de fibroblastos no tratados. Por el contrario, no se observaron cambios en la expresión de VCAM-1 y MMP-14 (**Figura 23, derecha**).

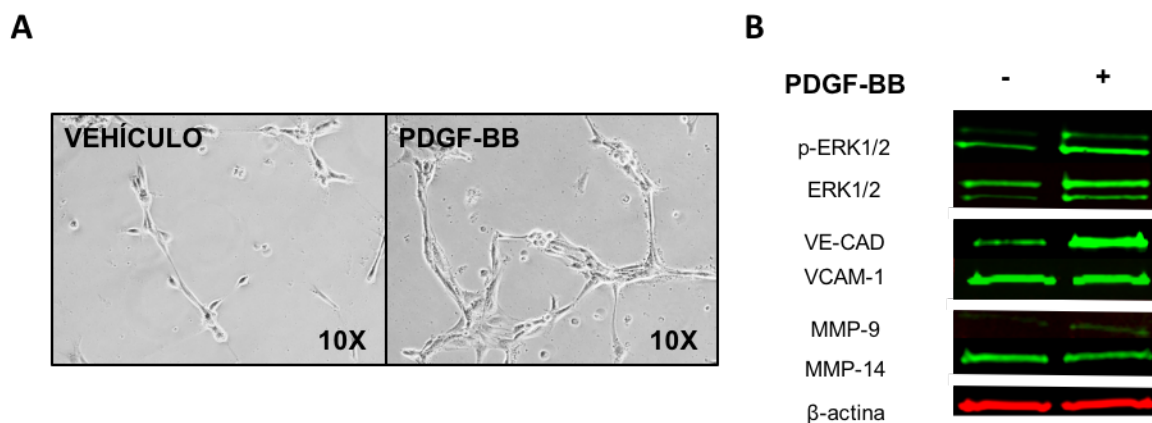


Figura 23. Las matrices derivadas de fibroblastos tratados con PDGF-BB estimulan la activación y tubulogénesis de las células HUVECs. (A) Imágenes representativas de células HUVECs sembradas durante 16 h sobre matrices 3D de fibroblastos BJ-hTERT tratados con PDGF-BB (20 ng/ml), según se indica. **(B)** Inmunotransferencia de p-ERK1/2, ERK1/2, VE-CADHERINA, VCAM-1, MMP-9, MMP-14 y de β-actina (control de carga) de células HUVECs sembradas sobre matrices 3D de fibroblastos BJ-hTERT.

En conjunto estos datos demuestran la importancia de la ordenación de la MEC en la tubulogénesis de células endoteliales *in vivo*, lo que se confirma al analizar los marcadores de activación de las mismas.

2.3. LA DESORDENACIÓN DEL COLÁGENO I POR EL INHIBIDOR DE LOX BLOQUEA LA TUBULOGÉNESIS DE CÉLULAS ENDOTELIALES

Para estudiar si la ordenación de las fibras de la MEC observada al estimular con PDGF-BB actuaba como un factor inductor del proceso de tubulogénesis de células HUVECs, se generaron matrices tratadas con un inhibidor (beta-aminopropionitrilo, BAPN) de la actividad de la enzima Lisil Oxidasa (LOX), responsable del entrecruzamiento de moléculas de la matriz, como la elastina y el Colágeno.

La organización celular de los fibroblastos no se vio afectada al tratar con el inhibidor BAPN (**Figura 24**). Tampoco se vio afectada la deposición de la FN1 (**Figura 25 A derecha**) ni la orientación de las fibras (**Figura 25 B**), mientras que el efecto de PDGF-BB sobre la organización y deposición del Colágeno I fue bloqueado cuando los fibroblastos se trataron con concentraciones crecientes de BAPN durante el proceso de generación de matrices (**Figura 25 A izquierda y Figura 25 B**).

BJ-hTERT EN CULTIVO

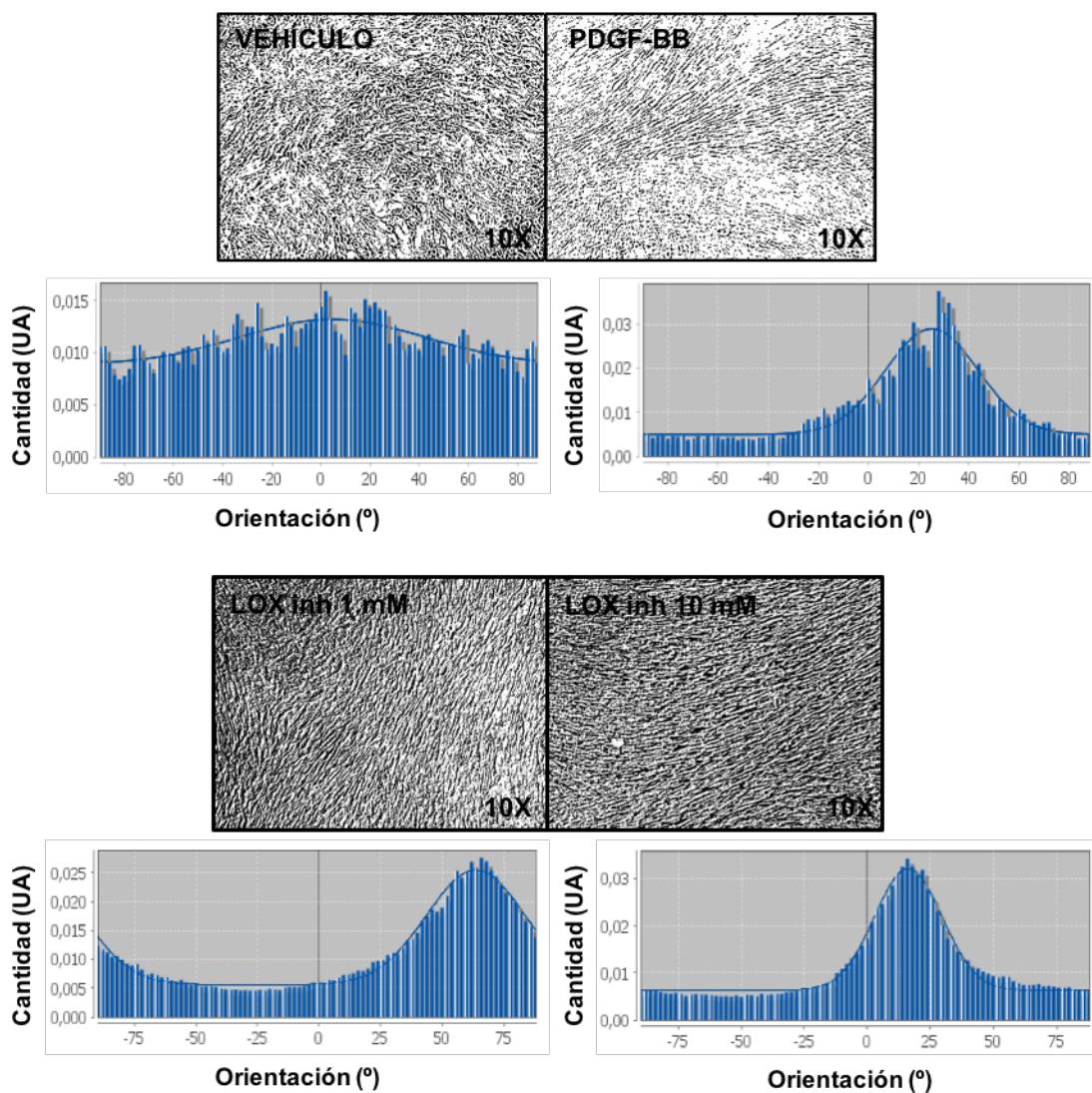
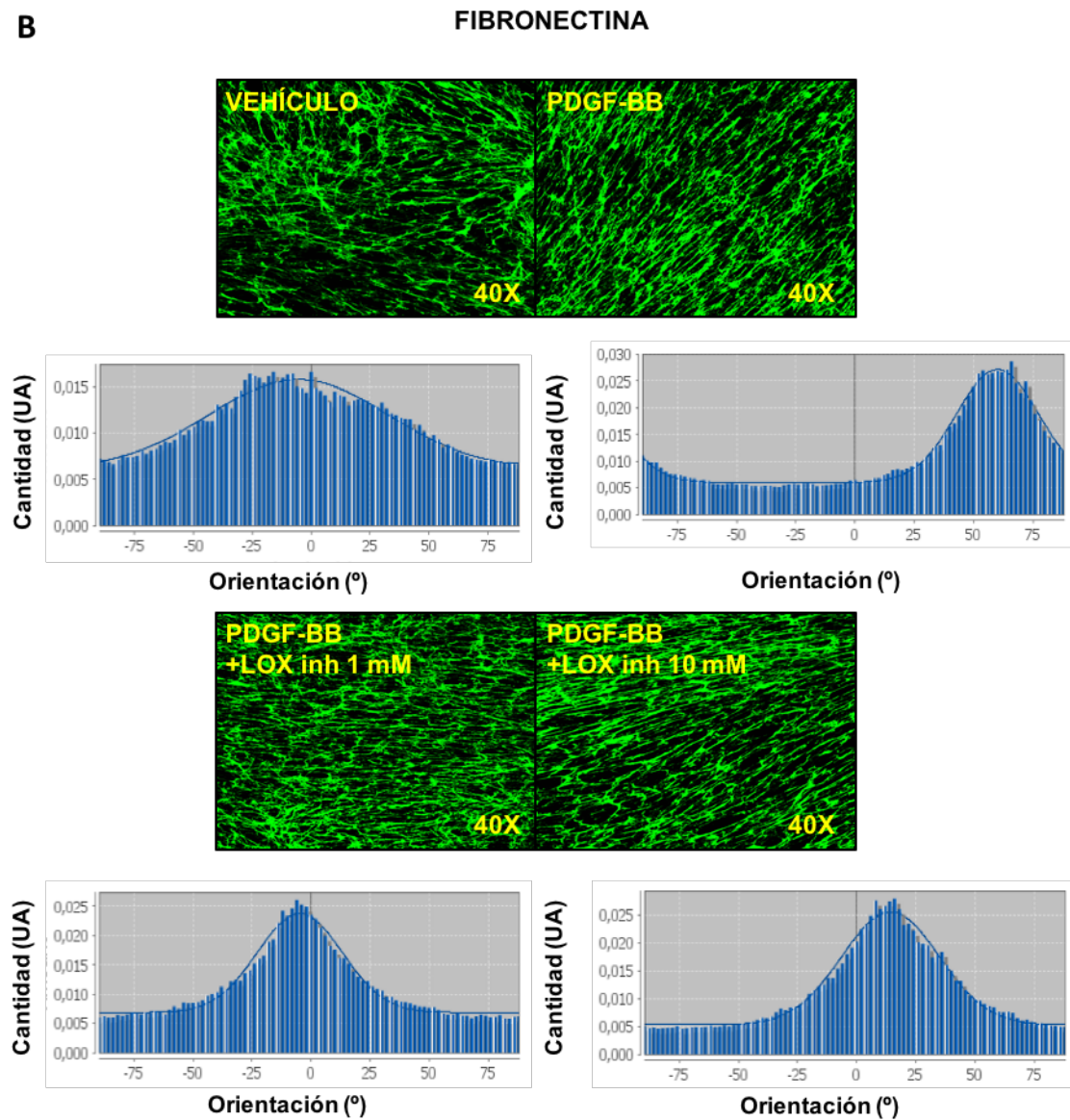
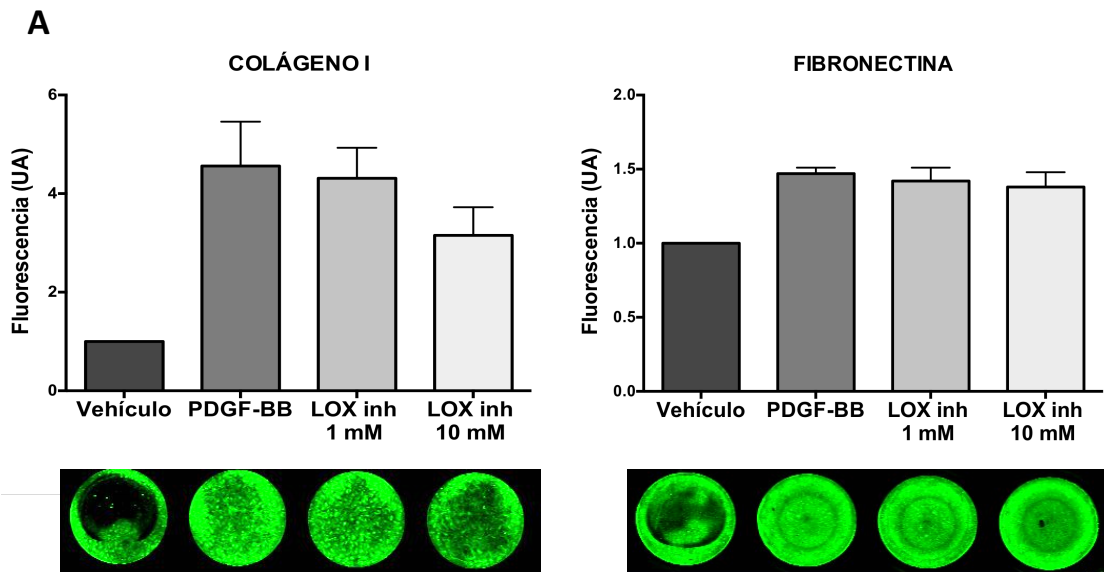


Figura 24. PDGF-BB estimula la organización de los fibroblastos BJ-hTERT y su crecimiento en multicapa. Imágenes en binario representativas de la orientación celular (arriba) de los fibroblastos BJ-hTERT tratados o no con PDGF-BB (20 ng/ml), y BAPN a 1mM y 10 mM, según se indica, y los histogramas de direccionalidad (abajo), calculados con el programa ImageJ representando la frecuencia de distribución de ángulos de las células (centrados en el ángulo 0°).



C

COLÁGENO I

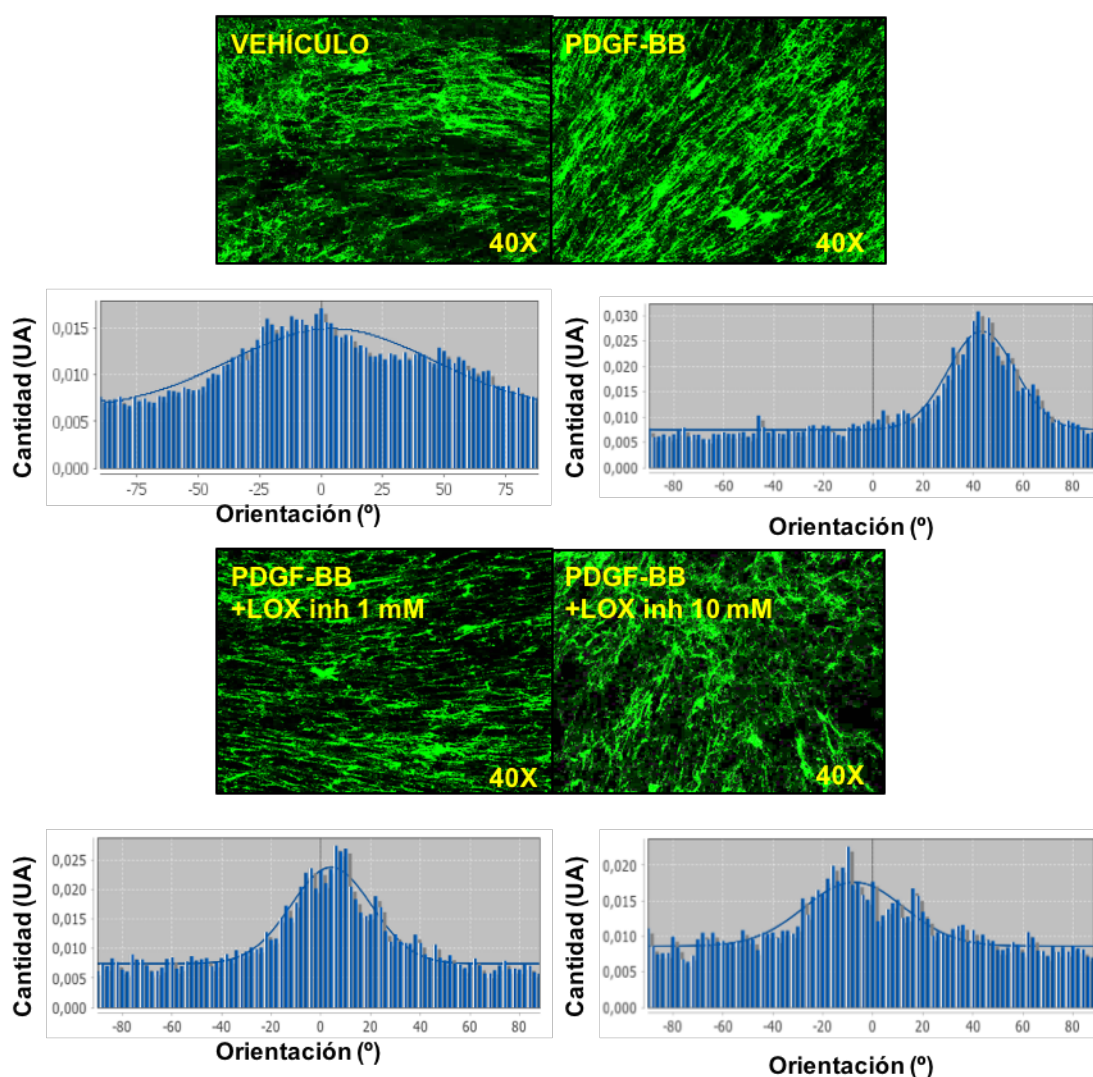


Figura 25. El inhibidor de LOX (BAPN) reduce la deposición y orientación de las fibras de Colágeno I. (A) Deposición de FN1 y Colágeno I en matrices 3D generadas por fibroblastos BJ-hTERT tratados con PDGF-BB (20 ng/ml) y BAPN a 1mM y 10 mM, según se indica. Imágenes representativas realizadas mediante inmunofluorescencia de las matrices 3D, reveladas y cuantificadas por densitometría usando el equipo Odyssey Infrared Imaging System (Li-COR Biosciences) y una compensación de foco de 3 mm. **(B)** Imágenes representativas de FN1 y **(C)** Colágeno I realizadas mediante inmunofluorescencia de las matrices 3D generadas por fibroblastos BJ-hTERT tratados con PDGF-BB (20 ng/ml), y BAPN a 1mM y 10 mM, según se indica. Debajo de las imágenes se muestran los histogramas de direccionalidad calculados con el programa ImageJ representando la frecuencia de distribución de ángulos de las fibras (centrados en el ángulo 0°).

Como cabía esperar, no se dieron cambios en la expresión de la proteína al tratar con BAPN, ya que dicho compuesto actúa como inhibidor competitivo de LOX y no sobre su expresión (**Figura 26**).

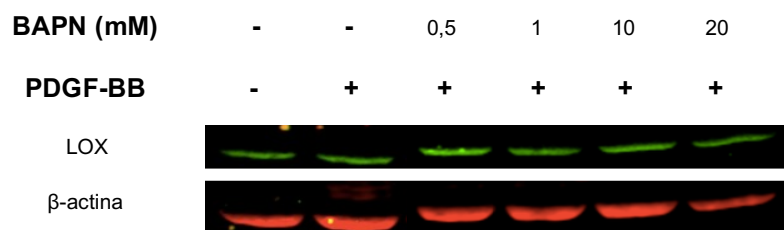


Figura 26. El tratamiento de fibroblastos BJ-hTERT con concentraciones crecientes de BAPN no inhibió la expresión de la proteína LOX. Inmunotransferencia de LOX y β -actina (control de carga) de fibroblastos BJ-hTERT tratados durante 24 horas con PDGF-BB (20 ng/ml) y concentraciones crecientes de BAPN (0.5, 1, 10 y 20 mM), según se indica. BAPN: Beta-Aminopropionitrilo (Inhibidor de LOX)

Cabe destacar, que los efectos dependientes de PDGF-BB sobre la tubulogénesis de las células HUVECs se revirtieron cuando estas se sembraron sobre matrices 3D de fibroblastos tratados con BAPN, demostrando así la importancia de la orientación de las fibras en dicho proceso (Figura 27).

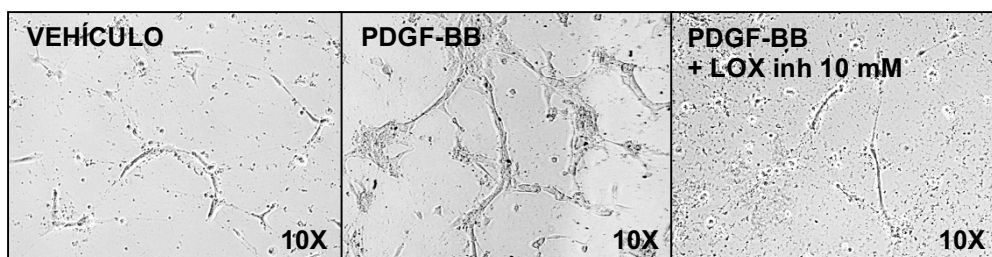


Figura 27. Las matrices derivadas de fibroblastos tratados con BAPN bloquean la tubulogénesis de las células HUVECs. Imágenes representativas de células HUVECs sembradas durante 16 h sobre matrices 3D de fibroblastos BJ-hTERT tratados con PDGF-BB (20 ng/ml) y con el inhibidor de LOX, BAPN (10 mM), según se indica.

2.4. EL ALINEAMIENTO DE LOS FIBROBLASTOS, EL REMODELADO DE LA MATRIZ Y LA FORMACIÓN DE TÚBULOS SON DEPENDIENTES DE LA RUTA FAK

Con el fin de profundizar en el mecanismo molecular implicado en el remodelado de la MEC, se analizó la activación de algunas de las vías implicadas en la señalización intracelular de los receptores tirosina-quinasa (RTKs), como es el caso del receptor β del factor PDGF-BB (PDGFR- β). El análisis mediante Western-Blot de los fibroblastos tratados con PDGF-BB reveló un aumento en la fosforilación de los residuos de la treonina 202 y la tirosina 204 de la proteína ERK1/2, así como del residuo serina 473 de la proteína Akt. Sin embargo no se detectaron cambios en la fosforilación de los residuos de tirosina 576 y 577 de la proteína FAK. Además, los fibroblastos BJ-hTERT se trataron con inhibidores específicos de las tres rutas a distintas concentraciones (UO126 para ERK1/2, LY294002 para PI3K/Akt y PF573228 para FAK), hasta conseguir la inhibición completa de las proteínas fosforiladas correspondientes (Figura 28).

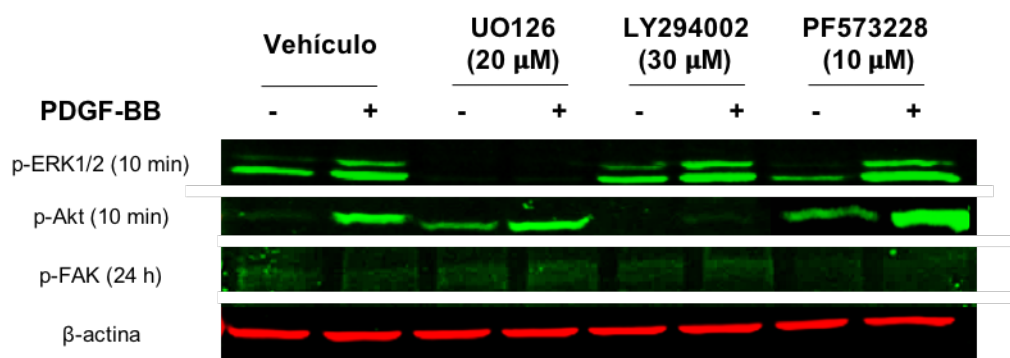


Figura 28. Puesta a punto de las concentraciones de los inhibidores de las rutas de ERK1/2, PI3K/Akt y FAK en fibroblastos BJ-hTERT. Inmunotransferencia de p-ERK1/2, p-Akt, p-FAK y β -actina (control de carga) de fibroblastos BJ-hTERT tratados o no con PDGF-BB (20 ng/ml) y distintas concentraciones de los inhibidores de ERK1/2 (UO126, 20 μ M), PI3K/Akt (LY294002, 30 μ M) y FAK (PF573228, 10 μ M), según se indica.

Posteriormente, para la generación de las matrices 3D, los fibroblastos se trataron con los inhibidores de las rutas anteriores cambiando el medio cada dos días, siguiendo el protocolo ya descrito anteriormente. El incremento en la deposición del Colágeno I al estimular con PDGF-BB se revirtió completamente al tratar los fibroblastos con el inhibidor para PI3K/Akt, mientras que el inhibidor de FAK mostró un efecto más patente en el bloqueo de la organización de los fibroblastos y de la orientación de las fibras de la matriz. Por otra parte, ni la morfología de los fibroblastos ni la orientación de las fibras se vieron afectadas al tratar las células con el inhibidor de ERK1/2, mostrándose sólo un ligero descenso en la deposición del Colágeno I (**Figuras 29 y 30**).

BJ-hTERT EN CULTIVO

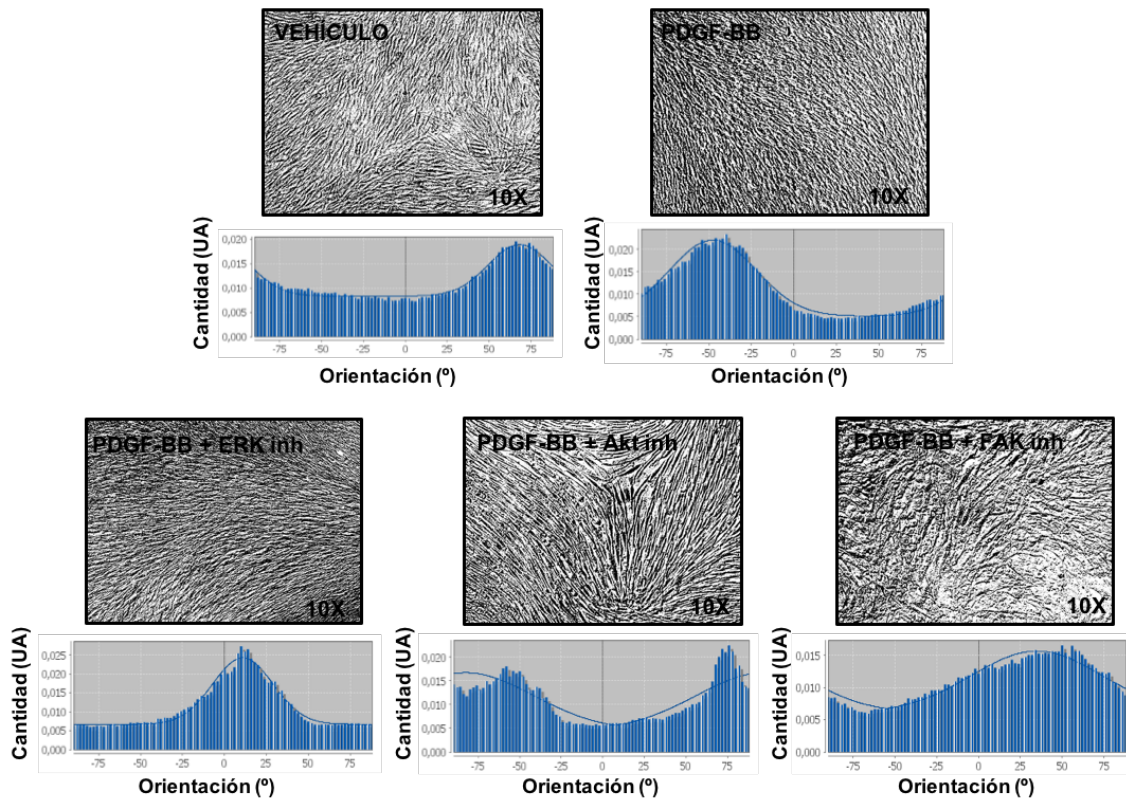
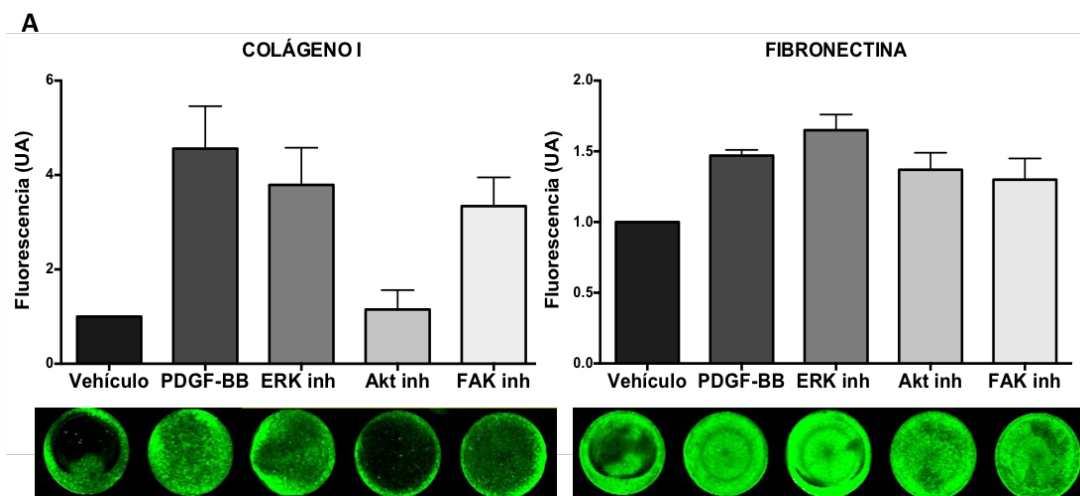


Figura 29. El alineamiento de los fibroblastos inducido por PDGF-BB es dependiente de la ruta FAK. Imágenes en binario representativas de la orientación celular de los fibroblastos BJ-hTERT tratados o no con PDGF-BB (20 ng/ml) y distintas concentraciones de los inhibidores de ERK1/2 (UO126, 20 μ M), PI3K/Akt (LY294002, 30 μ M) y FAK (PF573228, 10 μ M), según se indica. Debajo de las imágenes se muestran los histogramas de direccionalidad calculados con el programa ImageJ representando la frecuencia de distribución de ángulos de las células (centrados en el ángulo 0°).



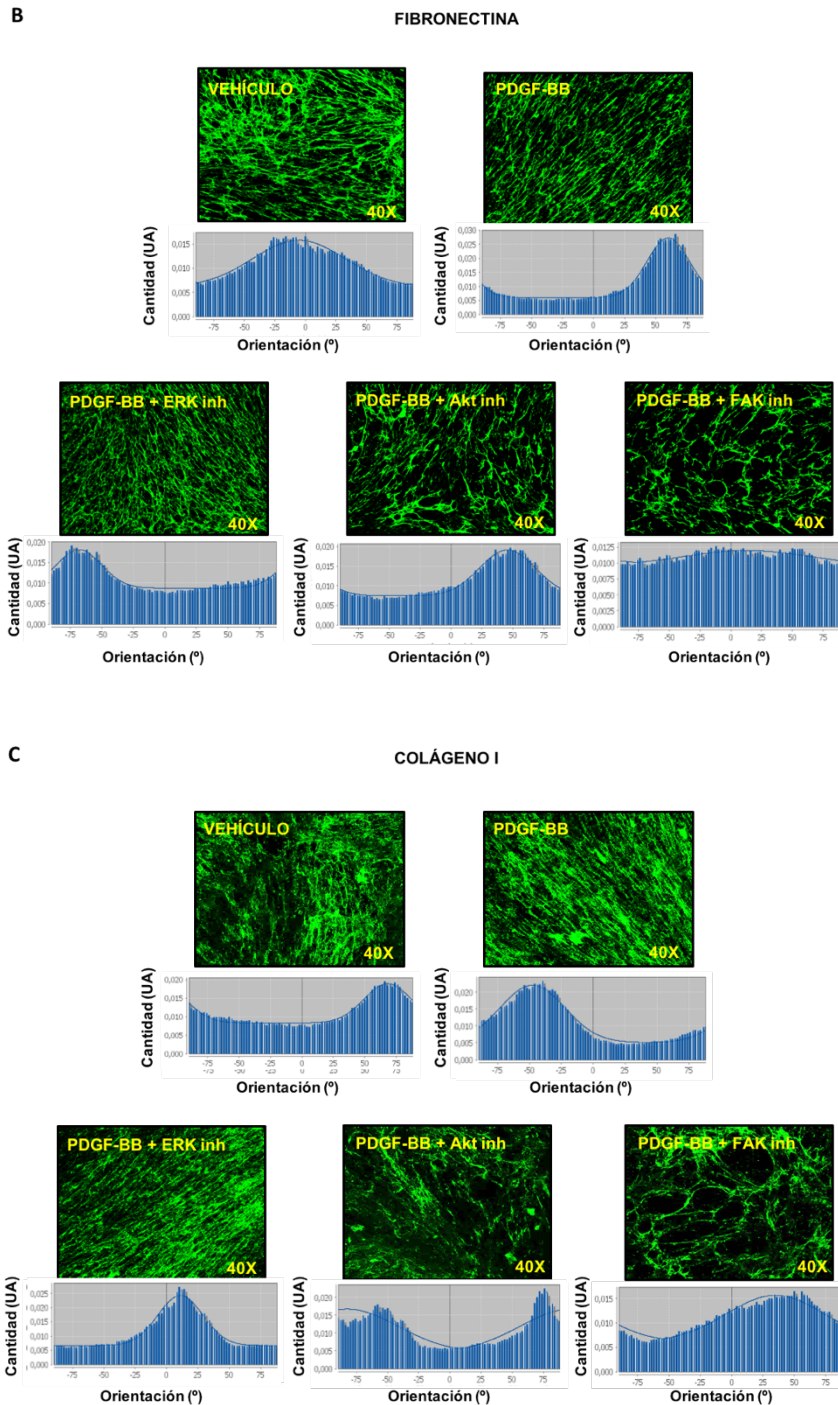


Figura 30. La deposición y orientación de las fibras de la MEC son propiedades dependientes de las rutas PI3K/Akt y FAK. (A) Deposición de FN1 y Colágeno I en matrices 3D generadas por fibroblastos BJ-hTERT tratados con PDGF-BB (20 ng/ml) y distintas concentraciones de los inhibidores de ERK1/2 (UO126, 20 μ M), PI3K/Akt (LY294002, 30 μ M) y FAK (PF573228, 10 μ M), según se indica. Imágenes representativas realizadas mediante inmunofluorescencia de las matrices 3D, reveladas y cuantificadas por densitometría usando el equipo Odyssey Infrared Imaging System (Li-COR Biosciences) y una compensación de foco de 3 mm. **(B)** Imágenes representativas de FN1 y **(C)** Colágeno I realizadas mediante inmunofluorescencia de las matrices 3D generadas por fibroblastos BJ-hTERT tratados con PDGF-BB (20 ng/ml) y distintas concentraciones de los inhibidores de ERK1/2 (UO126, 20 μ M), PI3K/Akt (LY294002, 30 μ M) y FAK (PF573228, 10 μ M), según se indica. Debajo de las imágenes se muestran los histogramas de direccionalidad calculados con el programa ImageJ representando la frecuencia de distribución de ángulos de las fibras (centrados en el ángulo 0°).

Teniendo en cuenta estos datos, se generaron matrices 3D derivadas de fibroblastos tratados PDGF-BB y con el inhibidor de FAK (PF573228), y se sembraron células HUVECs sobre las mismas para confirmar el efecto de la orientación de las fibras sobre el proceso de tubulogénesis observado anteriormente. Las imágenes revelan de nuevo un aumento de la tubulogénesis al tratar los fibroblastos con PDGF-BB. Dicho efecto se revierte completamente en las matrices derivadas del tratamiento con PDGF-BB y el inhibidor PF573228, observándose un fenotipo similar al de las células sembradas en las matrices control no tratadas (**Figura 31**).

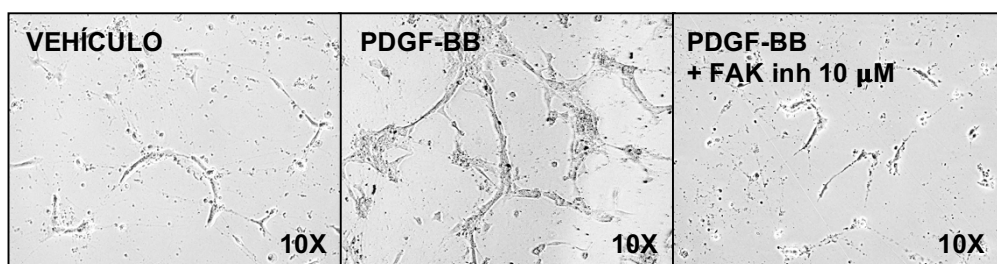


Figura 31. Las matrices derivadas de fibroblastos tratados con PF573228 bloquean la tubulogénesis de las células HUVECs. Imágenes representativas de células HUVECs sembradas durante 16 h sobre matrices 3D de fibroblastos BJ-hTERT tratados con PDGF-BB (20 ng/ml) y PF573228 (10 μ M), según se indica.

2.5. SNAI1 ES NECESARIO PARA EL ALINEAMIENTO DE LOS FIBROBLASTOS, EL REMODELADO DE LA MATRIZ EXTRACELULAR Y LA FORMACIÓN DE TÚBULOS INDUCIDOS POR PDGF-BB

En la primera parte de este trabajo, se ha presentado a SNAI1 como un posible marcador de fibroblasto activado con efectos paracrinicos capaces de estimular la tumorigenicidad de las células de cáncer de colon mediante el incremento de migración y proliferación de las mismas. En este contexto y teniendo en cuenta los datos anteriores, se ha querido estudiar nuevamente el efecto de la expresión de SNAI1 en fibroblastos, concretamente el efecto pro-angiogénico mediado por la MEC. Como punto de partida, se analizó mediante Western-Blot el papel de las distintas rutas moleculares (ERK1/2, PI3K/Akt y FAK) sobre la expresión proteica de SNAI1. Así, se vio que la expresión de SNAI1, tanto del ARNm como de la proteína, aumentaba en fibroblastos tratados con PDGF-BB (**Figura 32 A, B**), junto con un aumento en la expresión de α -SMA, la isoforma de la actina implicada en la contracción y el remodelado de la matriz extracelular (**Figura 32 C**). Además, la acumulación de SNAI1 en el interior del núcleo donde ejerce su función como factor de transcripción, se pudo observar en fibroblastos tratados con PDGF-BB, mientras que en los no tratados se observó un marcaje predominantemente citoplasmático (**Figura 32 D**).

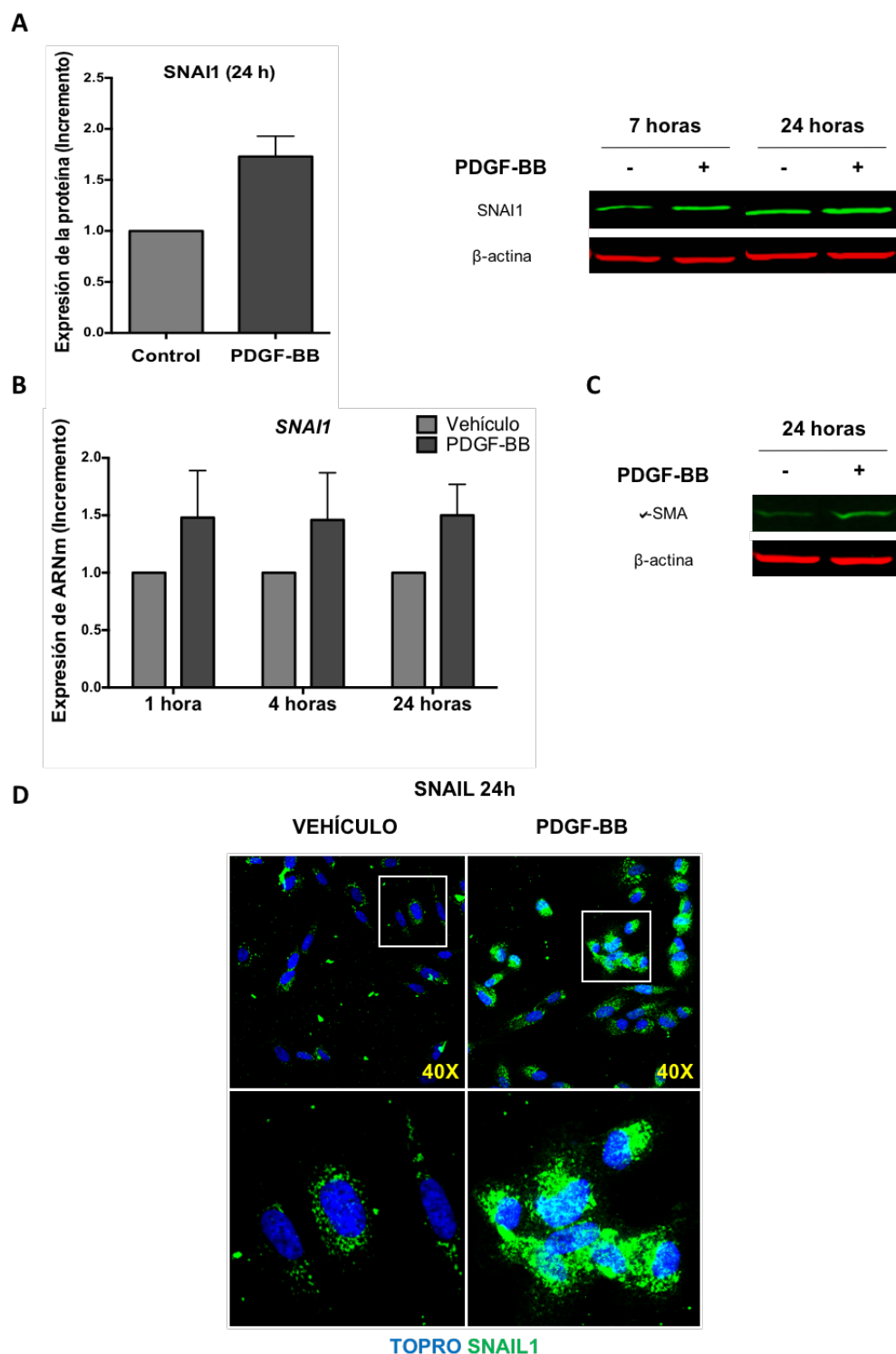
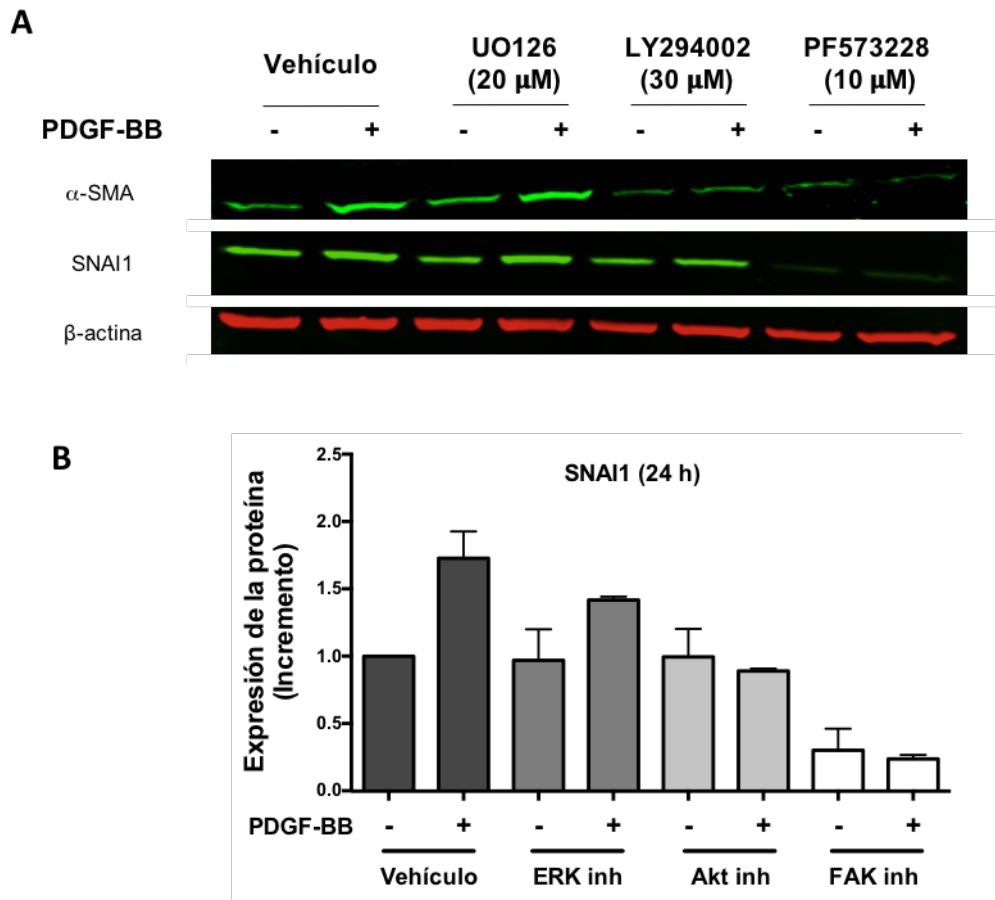


Figura 32. La expresión de SNAI1 y su internalización al núcleo aumentan con el tratamiento de PDGF-BB. (A) Cuantificación de la expresión en fibroblastos BJ-hTERT tratados con PDGF-BB (20 ng/ml) durante 24 horas, según se indica (izquierda). Imagen representativa de la inmunotransferencia (derecha) de SNAI1 y β -actina (control de carga) tras 7 y 24 horas de tratamiento con PDGF-BB. (B) Expresión del ARNm de *SNAI1* en fibroblastos BJ-hTERT tratados con PDGF-BB (20 ng/ml) durante 1, 4 y 24 horas, según se indica (izquierda). (C) Imagen representativa de la inmunotransferencia (derecha) de α -SMA y β -actina (control de carga) tras 24 horas de tratamiento con PDGF-BB (20 ng/ml), según se indica. (D) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de SNAI1 y TOPRO-3 (como marcador nuclear) en fibroblastos BJ-hTERT tratados con PDGF-BB (20 ng/ml) durante 24 horas, según se indica.

Sin embargo, al tratar con los inhibidores específicos de las vías de señalización, tanto LY294002 (PI3K/Akt) como PF573228 (FAK) inhibieron parcialmente la expresión de α -SMA (**Figura 33 A**), pero sólo la preincubación con el segundo, inhibió la expresión de SNAI1 incluso por debajo de los niveles basales de expresión. El inhibidor de PI3K/Akt logró revertir el aumento en la expresión de SNAI1 mediado por PDGF-BB, hasta niveles similares a los fibroblastos control (**Figura 33 B**). Sin embargo, UO126 (ERK1/2) disminuyó muy ligeramente la expresión de SNAI1 y apenas modificó la expresión de α -SMA. Además la inhibición de FAK impidió también la acumulación de SNAI1 en el núcleo (**Figura 33 C**). Por tanto, FAK está regulando tanto la expresión de SNAI1 como su paso al núcleo donde ejerce su función como factor de transcripción.



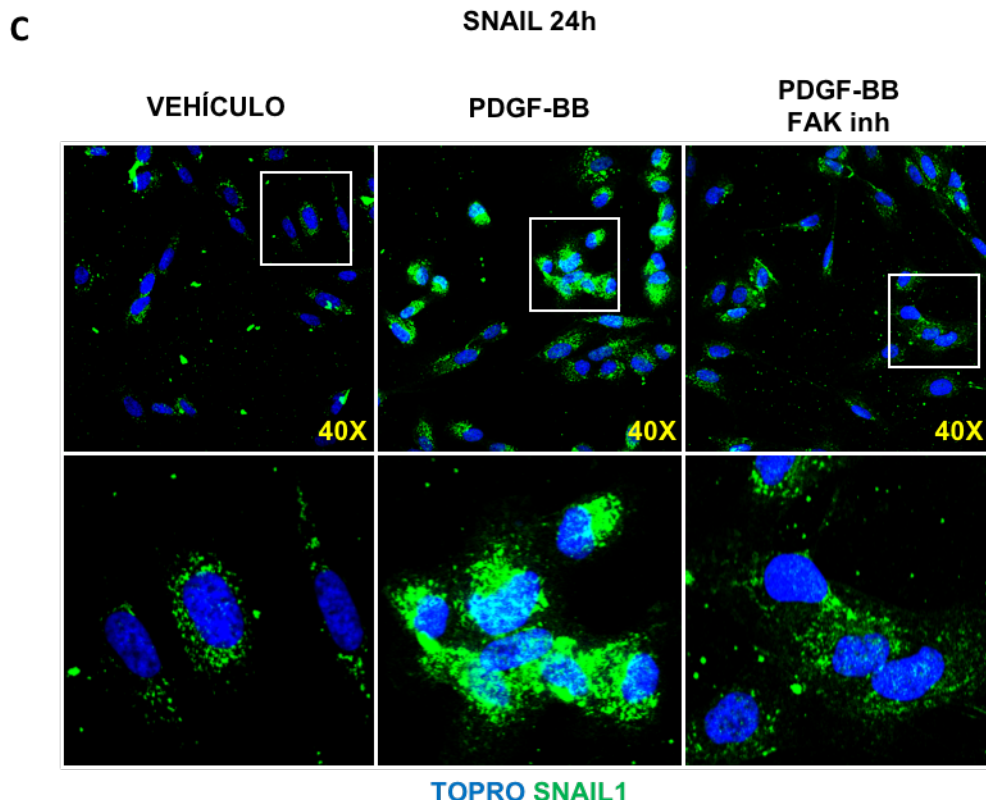


Figura 33. La expresión de SNAI1 y su internalización al núcleo son dependientes de la ruta de FAK. (A) Imagen representativa de la inmunotransferencia (derecha) de SNAI1, α -SMA y β -actina (control de carga) en fibroblastos BJ-hTERT tratados con PDGF-BB (20 ng/ml) durante 24 horas, según se indica. **(B)** Cuantificación de la expresión del SNAI1 en fibroblastos BJ-hTERT tratados durante 24 horas con PDGF-BB (20 ng/ml) y distintas concentraciones de los inhibidores de ERK1/2 (UO126, 20 μ M), PI3K/Akt (LY294002, 30 μ M) y FAK (PF573228, 10 μ M), según se indica. **(C)** Imágenes representativas de la Inmunofluorescencia de SNAI1 y TOPRO-3 (como marcador nuclear) en fibroblastos BJ-hTERT tratados con PDGF-BB (20 ng/ml) y FAK (PF573228, 10 μ M) durante 24 horas, según se indica.

Por otra parte, SNAI1 se ha descrito como un factor de transcripción que, generalmente, actúa como represor, pero que también es capaz de inducir la expresión de algunas proteínas de la MEC y, por tanto, participar en el remodelado de la misma (Stanisavljevic et al., 2011, 2015; Zhang et al., 2013). Teniendo en cuenta este dato, se generaron matrices 3D con fibroblastos MEFs (del inglés *Mouse Embryonic Fibroblasts*) salvajes o Snai1 (+/+), y fibroblastos con Snai1 delecionado o Snai1 (-/-), que además se trataron con PDGF-BB. Los fibroblastos MEFs Snai1 (+/+) presentaron un crecimiento en multicapa y se alinearon en torno a un ángulo preferente cuando eran tratados con PDGF-BB, al igual que ocurría con los BJ-hTERT; mientras los fibroblastos MEFs Snai1 (-/-) crecían en monocapa y no se ordenaban de forma paralela, independientemente de la estimulación o no con el factor (**Figura 34 A**).

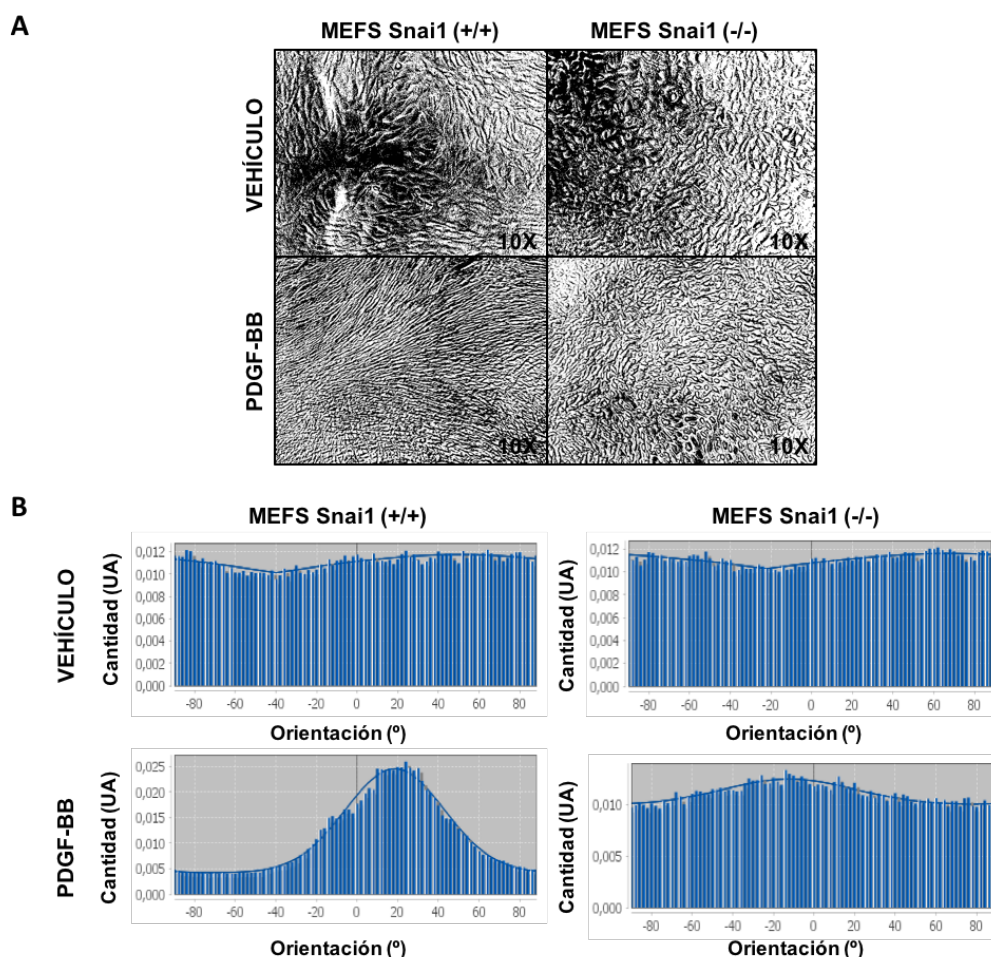
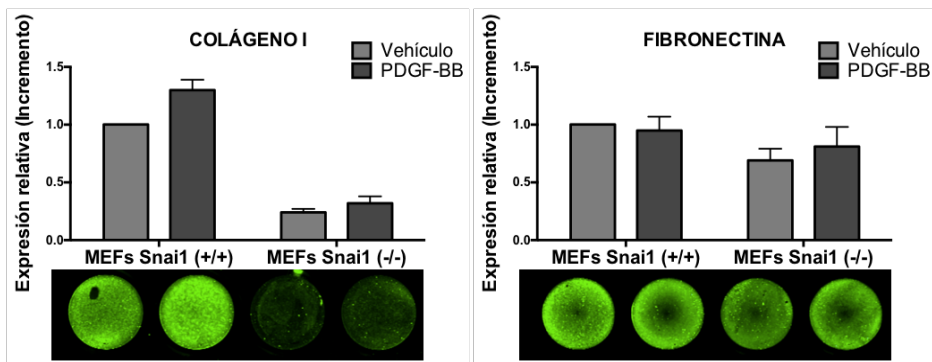


Figura 34. El alineamiento de los fibroblastos inducido por PDGF-BB es dependiente de la expresión de SNAI1. (A) Imágenes en binario representativas de la orientación celular de los fibroblastos MEFS salvajes y Snai1 (-/-) tratados o no con PDGF-BB (20 ng/ml), según se indica. **(B)** Histogramas de direccionalidad calculados con el programa ImageJ representando la frecuencia de distribución de ángulos de las células (centrados en el ángulo 0°).

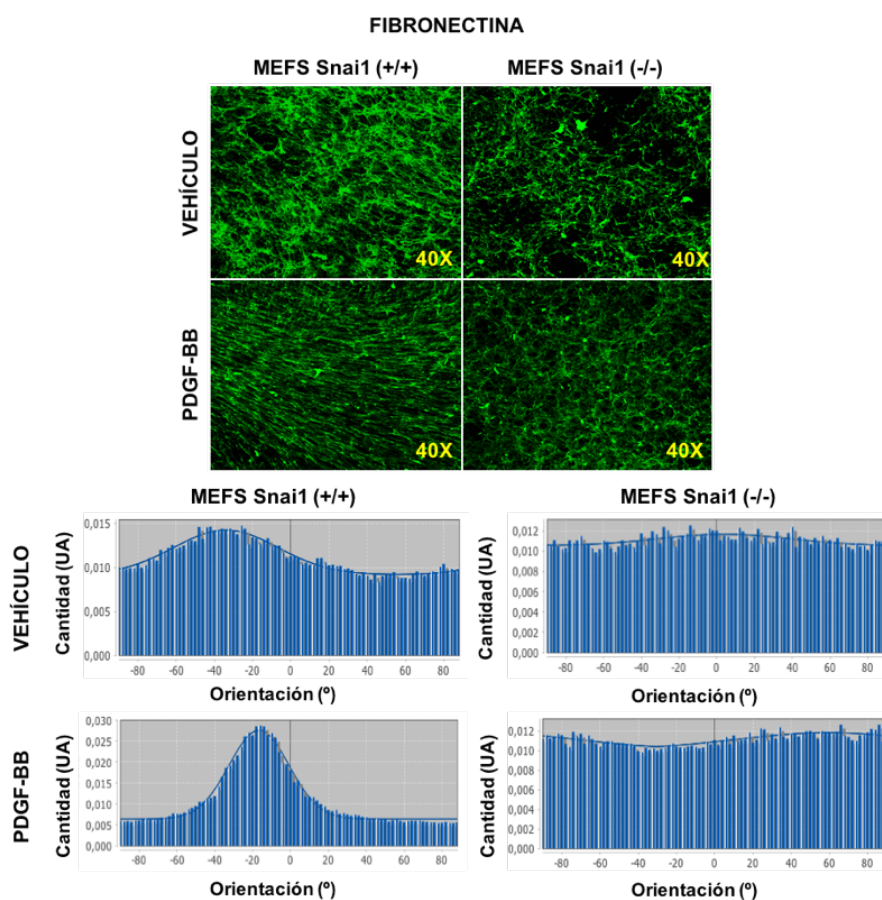
Al lisar los fibroblastos y analizar la matriz producida, se pudo observar un aumento en la deposición del Colágeno I en aquellas matrices procedentes de fibroblastos salvajes tratados con PDGF-BB, respecto a los fibroblastos sin tratar. Cabe destacar que, los fibroblastos con Snai1 deplecionado, generaron matrices con menor cantidad de Colágeno I que las células con expresión de Snai1, independientemente de la estimulación con el ligando. Por otro lado, los niveles de deposición de FN1 apenas fueron afectados ni por la expresión de Snai1 ni por el factor de crecimiento (**Figura 35 A**).

Sin embargo, tal y como muestran las imágenes de microscopía confocal y los diagramas de direccionalidad, el tratamiento con PDGF-BB en los fibroblastos Snai1 (+/+) estimuló un alto grado de organización en las fibras de Colágeno I y FN1, ordenación que no se daba en ninguna de las condiciones con los fibroblastos sin expresión de Snai1 (**Figura 35 B,C**).

A



B



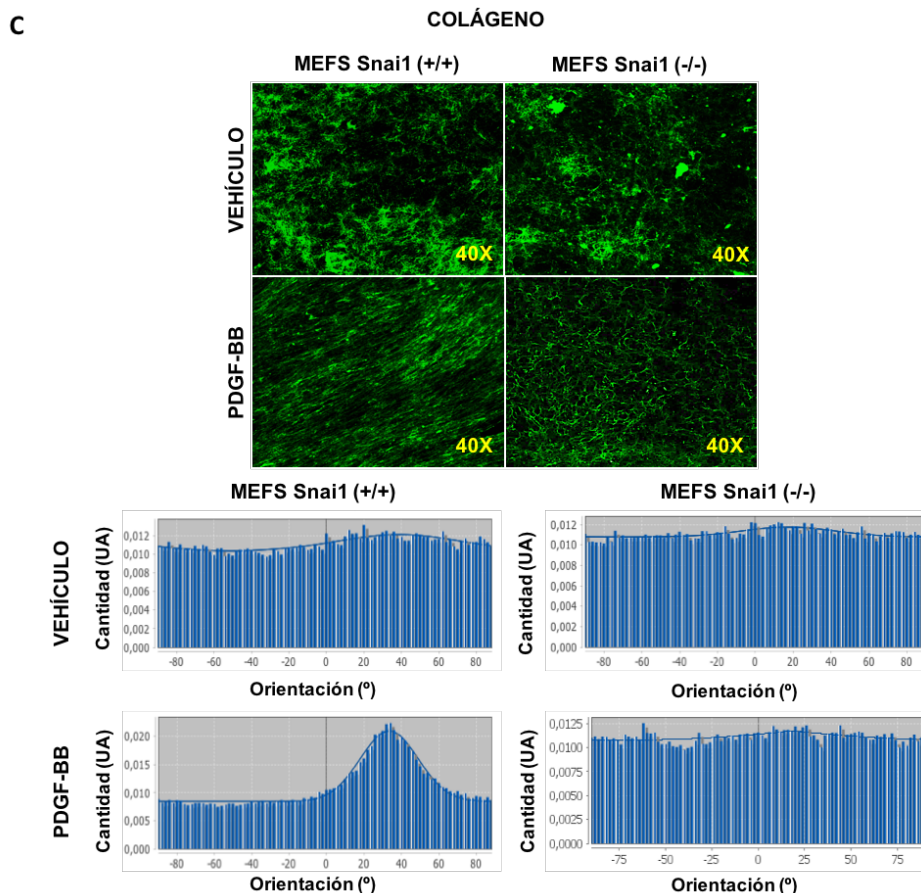


Figura 35. La deposición y orientación de las fibras de la MEC son propiedades dependientes de la expresión de SNAI1. (A) Deposición de FN1 y Colágeno I en matrices 3D generadas por fibroblastos MEFs salvajes y Snai1 (-/-) tratados o no con PDGF-BB (20 ng/ml), según se indica. Imágenes representativas realizadas mediante inmunofluorescencia de las matrices 3D, reveladas y cuantificadas por densitometría usando el equipo Odyssey Infrared Imaging System (Li-COR Biosciences) y una compensación de foco de 3 mm. (B) Imágenes representativas de FN1 y (C) Colágeno I realizadas mediante inmunofluorescencia de las matrices 3D generadas por fibroblastos MEFs salvajes y Snai1 (-/-) tratados o no con PDGF-BB (20 ng/ml), según se indica. Debajo de las imágenes se muestran los histogramas de direccionalidad calculados con el programa ImageJ representando la frecuencia de distribución de ángulos de las fibras (centrados en el ángulo 0°).

En este escenario, y siguiendo con las posibles funciones paracrinas se estudió la expresión de SNAI1 en fibroblastos como mediadora de los efectos pro-angiogénicos inducidos por PDGF-BB a través de la MEC. Como se describió en Materiales y Métodos, tras el lisado de los fibroblastos, se sembraron células HUVECs sobre las matrices 3D para estudiar el proceso de formación de túbulos. Sólo se observó formación de estructuras tubulares similares a capilares en aquellas células endoteliales sembradas sobre matrices 3D procedentes de MEFs Snai1 (+/+) tratados con PDGF-BB (**Figura 36**). Apoyando estos datos, se observó que las matrices derivadas de fibroblastos tratados con PDGF-BB modificaron algunos marcadores de activación endotelial de forma dependiente de Snai1. De esta forma, las células HUVECs sembradas en matrices 3D derivadas de MEFs Snai1 (-/-) revelaron un descenso en marcadores de activación endotelial como son pERK1/2, VE-Cadherina y

MMP-9, y un ligero aumento en los niveles de la proteína VCAM1 (**Figura 36**). De nuevo, no se observaron cambios en la expresión de MMP-14.

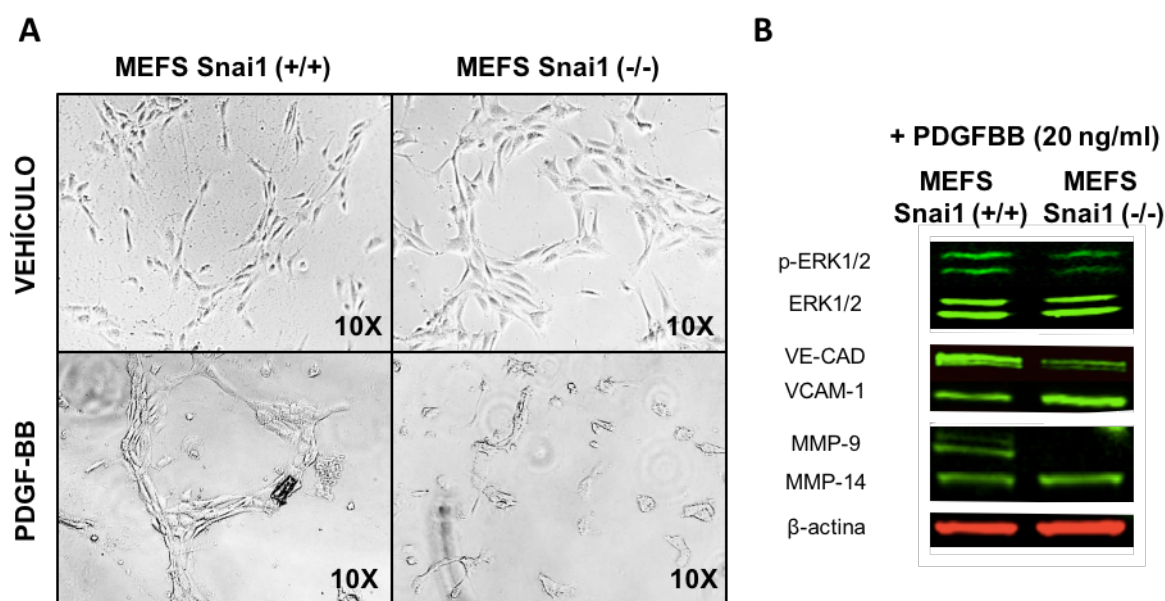


Figura 36. Las matrices derivadas de fibroblastos tratados con PDGF-BB estimulan la activación y tubulogénesis de las células HUVECs. (A) Imágenes representativas de células HUVECs sembradas durante 16 h sobre matrices 3D de fibroblastos BJ-hTERT tratados con PDGF-BB (20 ng/ml), según se indica. **(B)** Inmunotransferencia de p-ERK1/2, ERK1/2, VE-CADHERINA, VCAM-1, MMP-9, MMP-14 y de β-actina (control de carga) de células HUVECs sembradas sobre matrices 3D de fibroblastos BJ-hTERT.

En conjunto, los resultados presentados demuestran como la inhibición del eje FAK/SNAI1 revierte el remodelado de la MEC inducido por fibroblastos activos con PDGF-BB y, por tanto, se inhibe la morfogénesis de las células endoteliales.

2.6. FIBROBLASTOS EXPRESANDO SNAI1 INDUCEN LA INVASIÓN Y PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS HUVECS

Los procesos de proliferación, migración e invasión que permiten el desarrollo de la neoangiogénesis tumoral van acompañados de cambios en la biomecánica de la MEC por parte de las células. Para investigar con mayor profundidad el papel de SNAI1 en la ordenación de la MEC y como este hecho afecta, a su vez, a la proliferación de las células endoteliales, se generaron de nuevo matrices 3D sobre las que se sembraron células HUVECs y se analizó la proliferación tras 3 días de incubación. De esta forma, las células HUVECs marcadas con un fluorocromo verde demostraron un incremento en el ratio de proliferación al cultivarse sobre matrices 3D de MEFs salvajes estimulados con PDGF-BB, respecto a las matrices 3D de MEFs salvajes no tratados. Sin embargo, las células HUVECs cultivadas sobre matrices de MEFs Snai1 (-/-) no presentaron cambios en el índice de proliferación independiente de la estimulación con el ligando PDGF-BB (**Figura 37**).

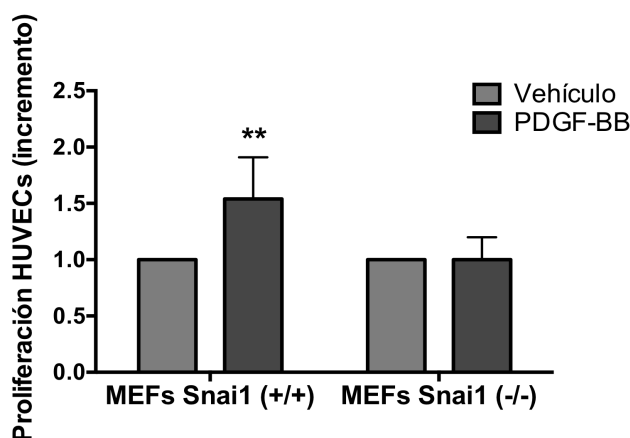


Figura 37. Matrices 3D de fibroblastos con expresión de SNAI1 inducen la proliferación de las células HUVECs. Índice de proliferación de células HUVECs incubadas durante 72 horas sobre matrices 3D generadas por fibroblastos MEFs salvajes y Snai1 (-/-) tratados o no con PDGF-BB (20 ng/ml), según se indica.

Otro paso esencial en el proceso de neoangiogénesis es la invasión de las células a través de la MEC del tumor. En este sentido, se quiso comprobar el papel de PDGF-BB, mediado por la expresión de Snai1 en fibroblastos, en relación a las habilidades de invasión de las células endoteliales. Para ello, se desarrolló un sistema de co-cultivo, denominado “Cultivo Organotípico”, con el fin de mimetizar el papel del estroma tumoral con fibroblastos activos y matriz extracelular. Así, MEFs salvajes y MEFs Snai1 (-/-) tratados o no con PDGF-BB, se embebieron en geles de Colágeno I de rata y, una vez solidificó, en la parte superior se sembraron células HUVECs y se analizó su invasión mediante cortes en parafina. La tinción con Hematoxilina-Eosina reveló una mayor invasión en los geles con MEFs Snai1 (+/+), con células invadiendo tanto de forma individual (flechas) como de forma colectiva (cabezas de flecha), si se compara con los geles de MEFs Snai1 (-/-), donde sólo se pudo ver invasión de algunas células de forma aislada (**Figura 38 A**). Al comparar únicamente los geles con MEFs Snai1 (+/+) también se observaron diferencias remarcables si estos eran tratados con PDGF-BB, donde se apreciaba mayor presencia de células invadiendo en forma de cohorte, respecto a los no tratados donde la invasión fue menor y con predominio de células aisladas. Dado que la tinción con Hematoxilina-Eosina marca todo tipo de estructuras ácida y básicas y no es específico de un determinado tipo celular, se realizó un análisis por IHC con anticuerpos que permitió distinguir células endoteliales en proceso de invasión, con expresión de CD31 y VE-Cadherina, de los fibroblastos embebidos en el gel que no presentaron ningún marcaje (**Figura 38 A**).

En paralelo, al final del tratamiento, se cuantificó la habilidad de los fibroblastos para contraer los geles de Colágeno I del ensayo de invasión, como una característica propia de fibroblastos activos. Para ello se midió el diámetro de los geles al final del experimento,

observándose la máxima contracción del gel en los fibroblastos Snai1 (+/+) estimulados con PDGF-BB (4,40 ± 0,70 mm), en comparación con los MEFs Snai1 (+/+) no tratados (6,80 ± 1,32 mm). Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la contracción de los geles de los fibroblastos MEFs Snai1 (-/-), ya fueran tratados (12,60±0,55) o no (10,88±0,64 mm) con el factor de crecimiento (Figura 38B).

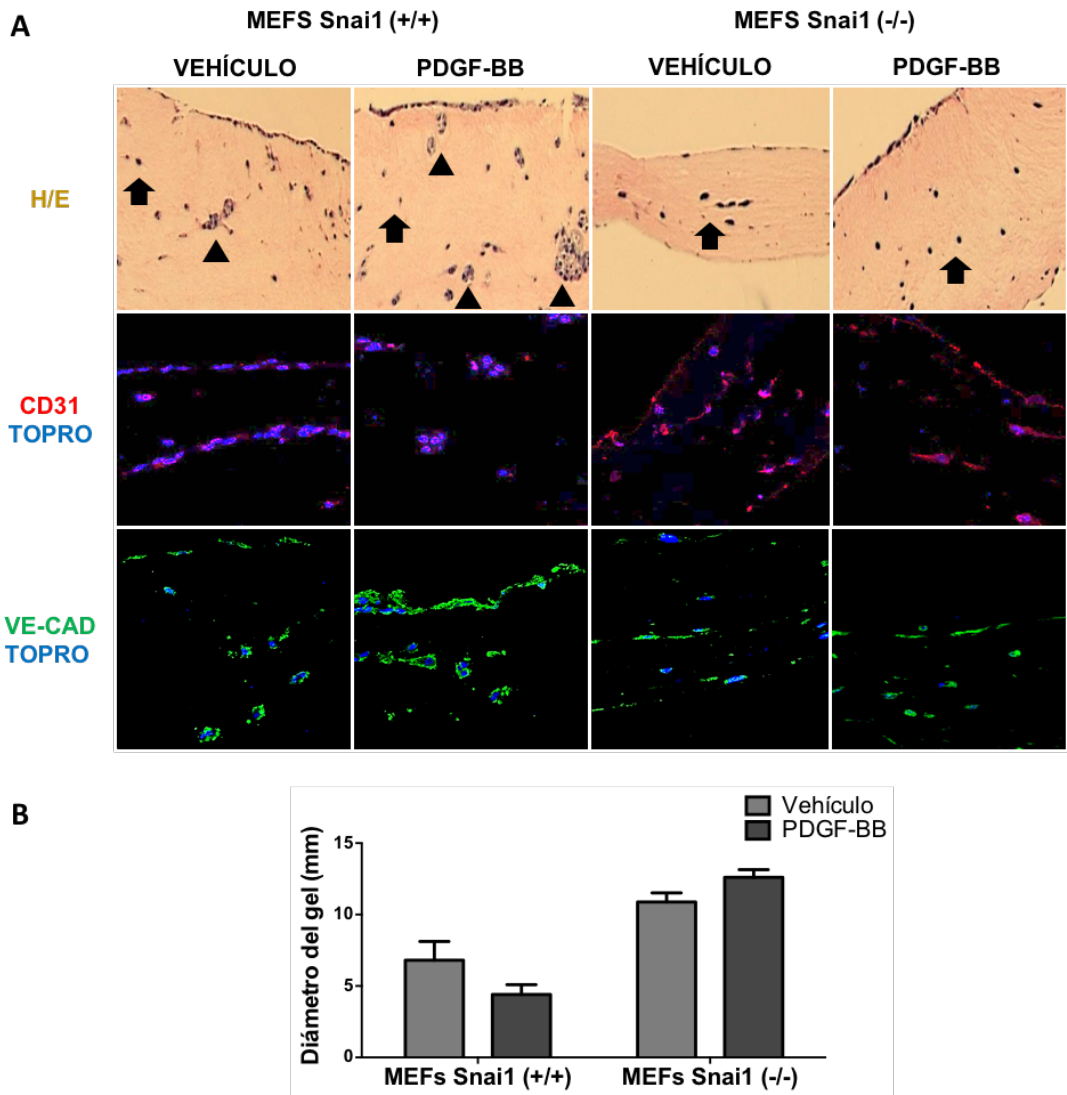
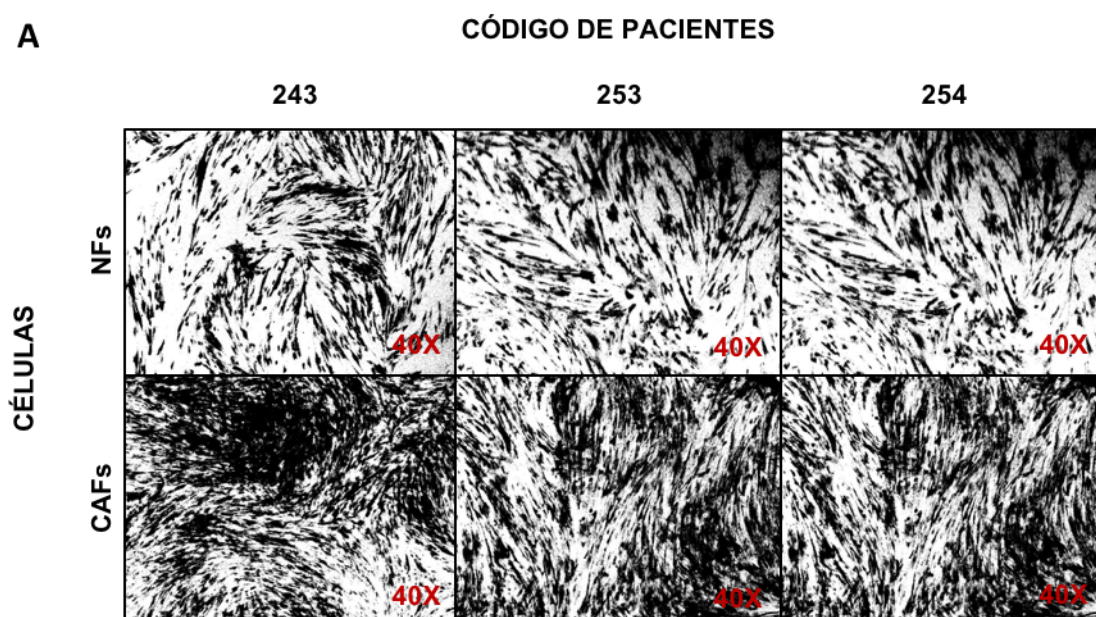


Figura 38. La invasión de células HUVECs es estimulada en co-cultivo organotípico con fibroblastos MEFs Snai1 (+/+) tratados con PDGF-BB y embebidos en geles de Colágeno I. (A) Imágenes representativas de secciones transversales de los geles de Colágeno teñidos con H/E donde se observa en cada tratamiento células HUVECs invadiendo de forma aislada (⬆) y/o de forma colectiva (▲). La identificación de las células endoteliales HUVECs, respecto de los fibroblastos MEFs embebidos en los geles, se realizó mediante inmunofluorescencia con los anticuerpos endoteliales CD31 (rojo) y VE-CAD (verde) y TOPRO-3 (como marcador nuclear). **(B)** Cuantificación del diámetro (mm) de los geles con los distintos tratamientos tras el co-cultivo y posterior fijación con PFA y parafina.

Por tanto, estos resultados demuestran el posible papel de los fibroblastos activos por la expresión de SNAI1 en distintas fases de la angiogénesis, como son la activación, proliferación e invasión de las células endoteliales.

2.7. EL MODELADO DE LA MEC EN CAFs ES DEPENDIENTE DE LA EXPRESIÓN EN FIBROBLASTOS DEL EJE PDGFR- β /SNAI1

Para comprobar los resultados anteriores en relación a la activación de los fibroblastos por el factor PDGF-BB y el modelado de la MEC, utilizamos de nuevo fibroblastos primarios procedentes de mucosa normal (NFs) y fibroblastos de tumores (CAFs) de pacientes de cáncer de colon, como una aproximación *ex vivo*. En primer lugar, comparamos la ordenación de la MEC en NFs y CAFs procedentes de 3 pacientes con cáncer de colon. Las imágenes de microscopía (**Figura 39A**) y los histogramas de direccionalidad (datos no mostrados) revelaron un aumento en la ordenación de los CAFs en cultivo, así como mayor organización de las fibras de la MEC, tanto de Colágeno I como de FN1, en comparación con los NFs (**Figura 39B**).



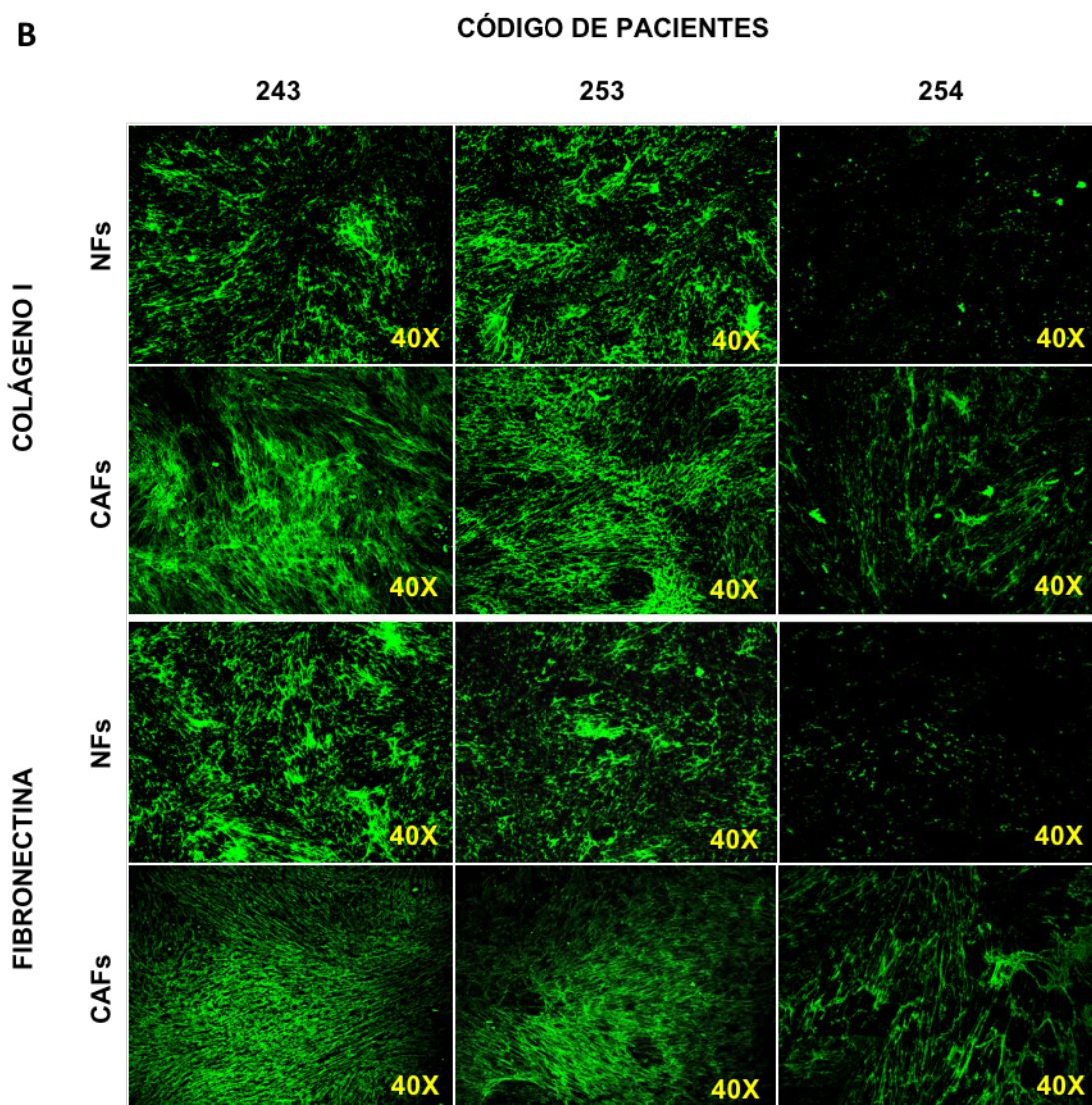


Figura 39. La organización celular y la ordenación de las fibras de Colágeno I y FN1 es mayor en los CAFs que en los NFs aislados del mismo paciente. (A) Imágenes representativas de la ordenación celular de fibroblastos primarios (NFs y CAFs) de distintos pacientes con CCR. **(B)** Imágenes representativas de la ordenación de las fibras de FN1 y Colágeno I realizadas mediante inmunofluorescencia de las matrices 3D generadas por NFs y CAFs, según se indica.

Además, cuando CAFs de 3 pacientes, diferentes a los usados en el ensayo anterior, se trataron con PDGF-BB, se observó que aquellos CAFs que fueron estimulados con el ligando generaron MECs 3D con un elevado grado de organización anisotrópica al analizar las fibras de FN1 y Colágeno I, en comparación con el análisis de las fibras de los CAFs no tratados (**Figura 40**).

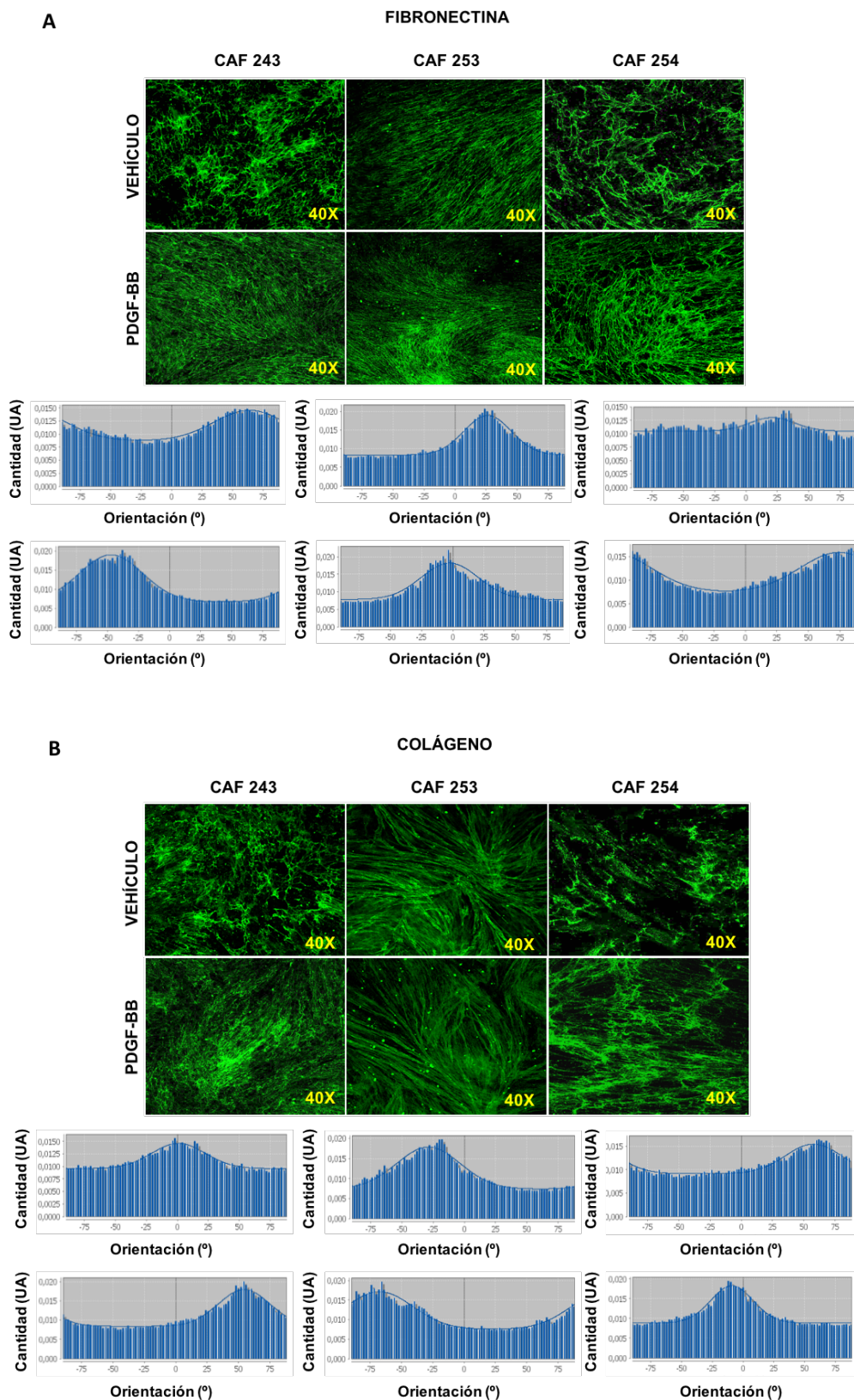


Figura 40. El modelado de la MEC en CAFs es dependiente de la expresión en fibroblastos del eje PDGFR- β /SNAI1. (A) Imágenes representativas de FN1 y (B) Colágeno I realizadas mediante inmunofluorescencia de las matrices 3D generadas por CAFs tratados o no con PDGF-BB (20 ng/ml), según se indica. Debajo de las imágenes se muestran los histogramas de direccionalidad calculados con el programa ImageJ representando la frecuencia de distribución de ángulos de las fibras (centrados en el ángulo 0°).

La cuantificación de la fosforilación del receptor PDGFR- β en los 3 CAFs, reveló diferentes niveles de respuesta al ligando PDGF-BB (**Figura 41 A**). Asimismo, los niveles de fosforilación del receptor correlacionaron de forma directa con los niveles de expresión de SNAI1, siendo el CAF 243 el que mostró mayores niveles de expresión de ambas proteínas y el CAF 253 el que presentó una menor respuesta al ligando (**Figura 41 B,C**). Este dato se comprueba al analizar de nuevo la organización de las fibras, donde se observó que, el CAF 243 presentó la mayor respuesta al ligando y, por tanto, el mayor incremento en la ordenación; mientras que el CAF 253 mostraba la menor respuesta a PDGF-BB y su ordenación apenas variaba en respuesta al factor, ya que el simple tratamiento con el vehículo daba lugar a matrices 3D muy ordenadas (**Figura 40**).

Por último, es de destacar además que, aquellos CAFs con niveles más altos de expresión de SNAI1 presentaron mayor respuesta a PDGF-BB, junto con un mayor incremento en la organización de las fibras de la MEC.

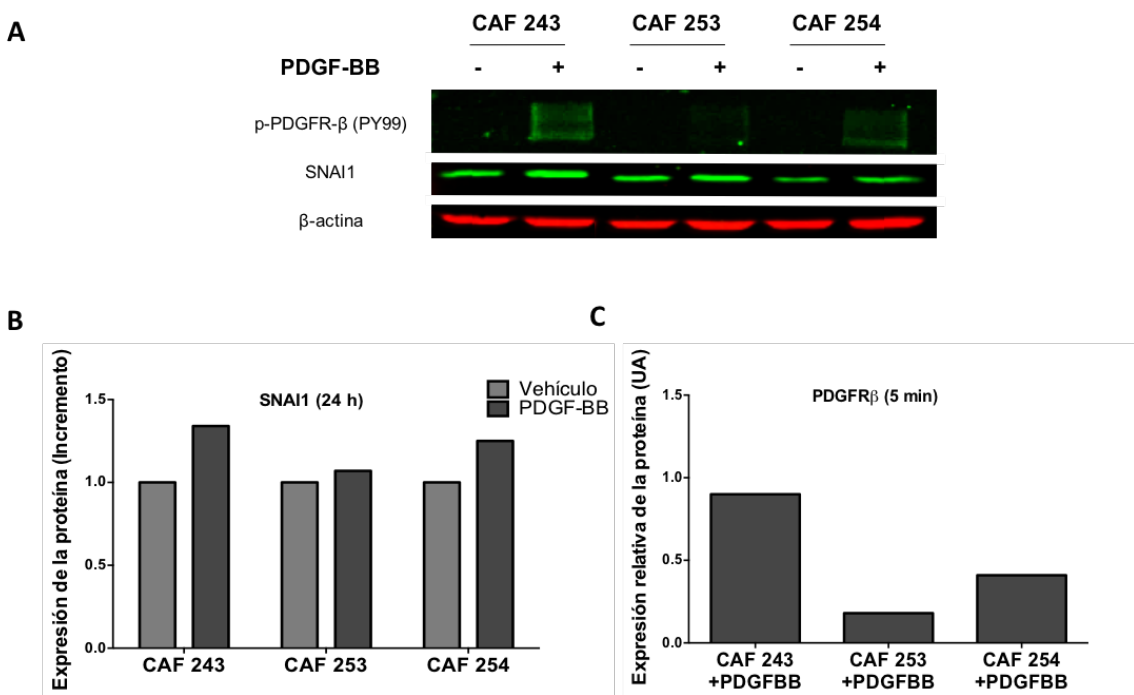


Figura 41. El modelado de la MEC en CAFs es dependiente de la expresión en fibroblastos del eje PDGFR- β /SNAI1. (A) Imagen representativa de la inmunotransferencia de p-PDGFR- β , SNAI1 y β -actina (control de carga) en CAFs aislados de 3 pacientes con CCR y tratados según se indica con PDGF-BB (20 ng/ml) durante 5 minutos para PDGFR- β y 24 horas para SNAI1. (B) Cuantificación de la expresión del SNAI1 a 24 horas y (C) p-PDGFR- β a 5 minutos en CAFs aislados de 3 pacientes con CCR tratados con PDGF-BB (20 ng/ml), según se indica.

2.8. LA EXPRESIÓN DE SNAI1 EN EL ESTROMA TUMORAL DE PACIENTES CON CCR SE ASOCIA A MAYORES NIVELES DE ANGIOGÉNESIS

Para estudiar el efecto de los fibroblastos con expresión de SNAI1 sobre la angiogénesis del tumor, se analizaron mediante IHC muestras de pacientes con CCR usando anticuerpos específicos para SNAI1 y CD34 como marcador de vasos sanguíneos. La expresión de SNAI1 se cuantificó como presencia / ausencia al tratarse de una proteína que se expresa en un bajo número de células. Por el contrario, la inmunodetección de CD34 se clasificó en 3 grados, donde 1 corresponde a las muestras con menor presencia de vasculatura y 3 a aquellas con mayor número de vasos.

La cuantificación y análisis de las muestras reveló una asociación directa entre la presencia de SNAI1 y la vasculatura, como se observa en la **Figura 42**, donde las muestras tumorales con marcaje positivo para SNAI1 presentaban grados 2 y 3 de angiogénesis, con un ratio 1,36 veces superior a las muestras de los pacientes con marcaje negativo para SNAI1. Además, el porcentaje de individuos con grados más altos del marcador CD34, grado 3, y por tanto mayor presencia de vasculatura era más elevado cuando SNAI1 era positivo en el estroma tumoral. Por el contrario, cuando SNAI1 no se expresaba en el estroma, el mayor porcentaje de pacientes presentaban bajos niveles de angiogénesis, 0 de inmunodetección de CD34, grado 1 (**Figura 42C**).

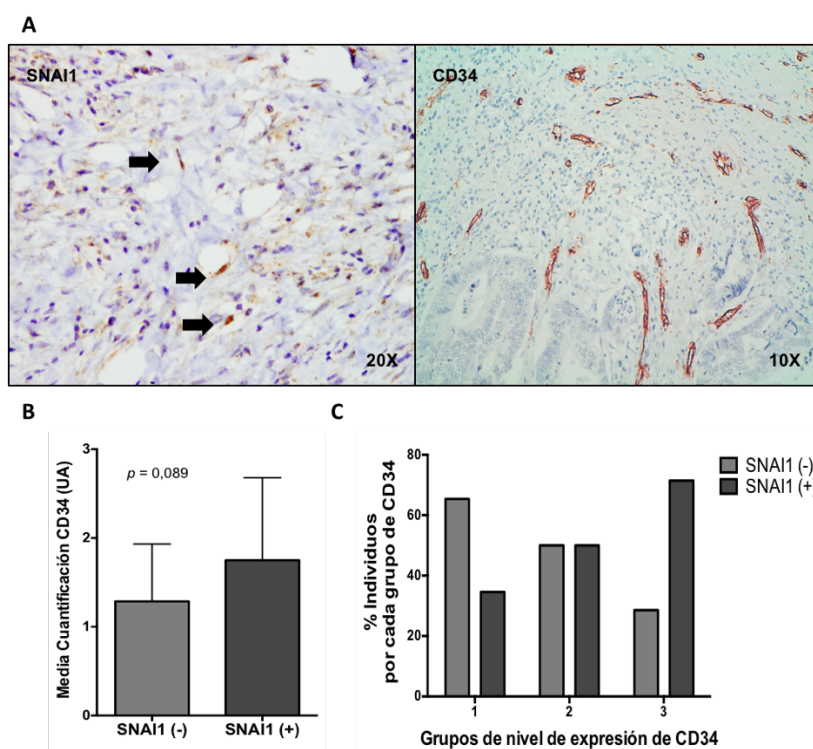


Figura 42. La expresión de SNAI1 en el estroma tumoral de pacientes con CCR se asocia a mayores niveles de angiogénesis. (A) Imágenes representativas de IHCs de pacientes con elevada expresión de SNAI1 y CD34. **(B)** Cuantificación de la expresión de CD34 en muestras de pacientes con CCR con y sin expresión de SNAI1 en el estroma tumoral. **(C)** Porcentaje de pacientes por cada grupo de expresión de CD34 en función de la presencia/ausencia de SNAI1 en el estroma tumoral.



DISCUSSION

DISCUSION

1. EFECTOS PROTUMOROGÉNICOS DE LA EXPRESIÓN DE SNAI1 EN FIBROBLASTOS SOBRE LAS CÉLULAS EPITELIALES DE CÁNCER DE COLON

Previamente, Francí et al. 2009 describió que, en tumores de colon, se observaba expresión de SNAI1 en células con fenotipo fibroblástico dentro del estroma del tumor. Además, pacientes con cáncer de colon con expresión de SNAI1 en el estroma tumoral presentaban una peor supervivencia. En paralelo, nuestro grupo describió los efectos paracrin, en células de cáncer de colon, derivados de la expresión de *SNAI1* en células tumorales sobre células normales adyacentes en muestras de tejido de pacientes con CCR, observándose además una regulación negativa de *CDH1* y *VDR* cuando las células epiteliales se co-cultivaban con células de cáncer de colon sobre-expresando *SNAI1* (Peña et al., 2009). Sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes a la asociación entre la expresión de SNAI1 en el estroma y la supervivencia de los pacientes con cáncer de colon, o el mecanismo paracrino derivado de las células con expresión de SNAI1, aún no están definidos. A pesar de que muchos estudios han centrado su interés en los efectos de la expresión de SNAI1 en células tumorales y su asociación con el proceso de EMT, pocos trabajos han analizado la expresión del factor de transcripción en fibroblastos aislados del estroma tumoral. Teniendo en cuenta este dato, nuestro objetivo en este estudio ha sido demostrar el incremento en la migración y la proliferación de las células tumorales inducido por fibroblastos con expresión de SNAI1 y mediado, al menos en parte, por cambios en el perfil de expresión de citoquinas.

1.1. SNAI1 COMO MARCADOR DE FIBROBLASTO ACTIVADO

En el presente trabajo, se establecieron cultivos primarios de CAFs procedentes de pacientes con cáncer de colon y NFs de la mucosa normal de colon, con el fin de determinar los distintos niveles de expresión de *SNAI1*. Cabe destacar que los CAFs presentaron niveles más elevados de expresión del gen que los fibroblastos de la mucosa normal, planteando el posible papel de SNAI1 como marcador de fibroblasto activado. Validando este resultado se encontró también una asociación entre los niveles de expresión del factor de transcripción y los niveles de otros marcadores de CAFs, como α -SMA y FAP, tanto en CAFs como en tejido tumoral de pacientes con cáncer de colon, bien por análisis del ARN o por tinción inmunohistoquímica. La implicación clínica de estos resultados subyace en la observación de que la expresión de SNAI1 se encuentra regulada positivamente en el estroma tumoral de pacientes con cáncer de colon. Además, la asociación entre la expresión de *SNAI1* y la expresión de marcadores de CAFs, como α -SMA y FAP,

que ya se habían relacionado previamente con la supervivencia de pacientes con cáncer colorrectal (Herrera, Herrera, et al., 2013), recalcan la importancia de SNAI1 como marcador de CAFs.

1.2. EFECTO PARACRINO DE LA EXPRESIÓN DE SNAI1 EN FIBROBLASTOS

Además, nuestros resultados describen una nueva función en relación a los efectos paracrinicos derivados de la expresión de SNAI1 en fibroblastos sobre células tumorales. Se siguieron distintas aproximaciones para evaluar los efectos pro-tumorigénicos de la expresión de SNAI1 en fibroblastos, donde se incluyeron experimentos *in vitro* de migración (con un panel de células de cáncer de colon y fibroblastos), CAFs primarios y un modelo *in vivo* de ratones desnudos con tumores subcutáneos. Todos los datos indicaron que la expresión de *SNAI1* en fibroblastos, en co-cultivo con células de cáncer de colon, aumenta las capacidades tumorigénicas de las mismas estimulando tanto la migración como la proliferación. El incremento en la respuesta migratoria de las células diana no estaba restringida únicamente al co-cultivo con fibroblastos sobre-expresando *SNAI1*, sino que también se observó una respuesta en presencia de células epiteliales transfectadas con el gen, confirmándose los resultados publicados previamente por Pena et al. 2009. Sin embargo, la migración de células de cáncer de colon aumento de forma más notable cuando *SNAI1* se expresaba en fibroblastos. El significado *in vivo* de estos resultados también se exploró en un modelo de tumor subcutáneo de ratón, donde se co-inyectaron células de cáncer de colon HT-29 junto con MEFs salvajes o MEFs *Snai1* (-/-) en 6 ratones. Los tumores derivados de la co-inyección de células HT-29 y MEFs *Snai1* (-/-) presentaron menores niveles de expresión de *Snai1* y menor tamaño tumoral que los derivados de la co-inyección con fibroblastos salvajes. Apoyando estos datos se observó, en estos mismos tumores derivados de MEFs *Snai1* (-/-), un menor índice de proliferación por el marcador Ki67 y mayor expresión de *CDH1*, así como ausencia de invasión hacia la capa muscular. Por tanto, la depleción de *Snai1* en fibroblastos de ratón, disminuye la habilidad de las células tumorales para generar tumores subcutáneos con capacidad de invasión, apoyando así los resultados observados *in vitro* sobre los efectos paracrinicos derivados de la expresión de *SNAI1* en fibroblastos. La regulación de *CDH1*, junto con el aumento en la migración de células de cáncer de colon co-cultivadas con fibroblastos expresando *SNAI1*, podría indicar un proceso parcial o completo de EMT en las células de cáncer de colon cuando estas se encuentran próximas a fibroblastos expresando SNAI1.

Por otro lado, ya se ha estudiado la relación entre el proceso de EMT y la proliferación, donde SNAI1 se ha descrito como un factor que regula de forma negativa el ciclo celular de células epiteliales de colon (Valdes et al., 2002; Peinado et al., 2003; Vega et al., 2004). Sin embargo, la asociación entre SNAI1 y el aumento de la proliferación también se ha reportado en otros trabajos.

Se ha visto un descenso en la expresión de CDH1 junto con un incremento en la expresión de SNAI1 en células en proliferación durante la formación del bulbo piloso (Jamora et al., 2005). El efecto ambiguo de SNAI1 observado sobre la proliferación podría depender del fondo genético del tipo celular, ya que en el trabajo aquí presentado se utilizaron fibroblastos expresando *SNAI1*, mientras que en los trabajos anteriores (Valdes et al., 2002; Peinado et al., 2003; Vega et al., 2004) se usaron células epiteliales. En línea con los resultados presentados, existen trabajos donde se ha demostrado que la expresión de SNAI1 en fibroblastos no retardaba la proliferación celular (Rowe et al., 2009; Batlle et al., 2013).

1.3. MCP-3 COMO MEDIADOR DEL EFECTO PRO-TUMOROGÉNICO

Existen varios estudios donde se ha confirmado que la sobreexpresión de *SNAI1* en células epiteliales, estimula la migración de diferentes tipos celulares, mediante la liberación de citoquinas pro-inflamatorias al medio (Lyons et al., 2008; Hwang et al., 2011; Hsu et al., 2014; Knab et al., 2014). Para comprobar si se daban cambios en la expresión de citoquinas, factores de crecimiento y otros inmunomoduladores, se llevó a cabo un array de expresión del medio condicionado de fibroblastos con sobreexpresión ectópica de *Snai1*. Se observaron 4 citoquinas sobreexpresadas (GRO- α , MCP-3, Fractalquina e I-309) y 2 con regulación negativa (IL-10 y G-CSF). A pesar de la necesidad de profundizar en la identificación de los mediadores paracrinicos dependientes de la expresión de *SNAI1* en fibroblastos, estos resultados indican que, en este tipo celular, la expresión del gen induce cambios en el perfil de citoquinas. Para validar la asociación entre la expresión de las citoquinas y la expresión de *SNAI1* se llevaron a cabo diferentes aproximaciones utilizando: (i) CAFs con distintos niveles de SNAI1; (ii) MEFs *Snai1* (+/+) y MEFs *Snai1* (-/-); (iii) 1.BR3.G salvajes y transfectados con *Snai1* y (iv) tejido tumoral de colon procedente de 65 pacientes. En todas las aproximaciones, se encontró asociación entre la expresión de *MCP-3* y *SNAI1*, mientras que otras citoquinas como GRO- α y Fractalquina también presentaron asociación estadísticamente significativa, pero no en todas las condiciones. Por tanto, en este trabajo, se presenta a MCP-3 como un posible mediador de los efectos paracrinicos dependientes de SNAI1 en la migración y la proliferación de células de cáncer de colon. Otros estudios apoyan la relevancia de esta citoquina: por ejemplo, líneas celulares procedentes de metástasis de pacientes con cáncer colorrectal se caracterizaron por presentar niveles mayores de expresión de *MCP-3/4*, en comparación con líneas celulares del tumor primario (Abajo et al., 2012). En cáncer gástrico, MCP-3 se ha relacionado también con invasión de la MEC, nódulos linfáticos metastásicos así como nódulos tumorales metastásicos (Hwang et al., 2012). En co-cultivo de células de carcinoma escamoso con CAFs, se observó sobre-expresión de *MCP-3* junto con aumento de la invasión y la migración de las células tumorales (Jung et al., 2010). Cabe resaltar que ARNsh dirigidos contra *MCP-3* suprimen la

tumorigenicidad derivada de la co-inyección de células tumorales con fibroblastos, dado que la proliferación celular del tumor se redujo a niveles similares a los observados en tumores derivados de la inyección sin fibroblastos (Rajaram et al., 2013).

1.4. CONSIDERACIONES FINALES

En resumen, este estudio remarca la importancia de la expresión de *SNAI1* en CAFs y fibroblastos, factor capaz de inducir un aumento en la capacidad tumorigénica de células de cáncer colorrectal por cambios en el perfil de citoquinas liberadas al medio. Aunque su papel en células epiteliales ha recibido especial atención en artículos publicados anteriormente, varios estudios han analizado los efectos de la expresión de *SNAI1* en la regulación de otros tipos celulares del microambiente tumoral, como fibroblastos o células mesenquimales. La expresión de *SNAI1* es necesaria para el mantenimiento de las células mesenquimales, impidiendo su diferenciación a adipocitos u osteoblastos, controlando así la capacidad tumorigénica de las mismas en la generación de sarcomas (Batlle et al., 2013; Alba-Castellón et al., 2014). *SNAI1* también juega un papel fundamental en el control de la arquitectura de la MEC por parte de los fibroblastos, guiando la migración de las células tumorales (Stanisavljevic et al., 2015). Además, no se detecta potencial invasivo ni inducción de la angiogénesis en fibroblastos con *SNAI1* delecionado (Rowe et al., 2009).

2. LA ACTIVACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES EN LA MATRIZ EXTRACELULAR ESTÁ MEDIADO POR EL EJE PDGF-BB/SNAI1 EN FIBROBLASTOS

En el presente trabajo establecemos por primera vez, el papel de la alineación de las fibras de la MEC en la angiogénesis del tumor de pacientes con cáncer colorrectal a través de la ruta PDGF-BB/FAK/SNAI1. Para ello utilizamos como sustrato matrices 3D generadas por fibroblastos, emulando la MEC estromal generada *in vivo* en los tejidos y tumores. Así, se observó que las MECs-3D derivadas de fibroblastos estimulados con PDGF-BB presentaron un incremento en la organización y deposición de las fibras proteicas que la conforman. Además, al sembrar células endoteliales sobre estas matrices ordenadas, se observó la activación de células endoteliales y la formación de estructuras tubulares similares a capilares, o tubulogénesis. Cabe destacar que, al inhibir la ruta de señalización FAK/SNAI1, la tubulogénesis fue bloqueada por un mecanismo asociado a la desordenación de las fibras de la matriz. El significado *in vivo* de estos resultados se demostró mediante el análisis realizado en tumores subcutáneos generados en ratones, en los que la co-inyección de fibroblastos con *SNAI1* deplecionado y células tumorales de cáncer de colon

revelaron una menor capacidad para inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos. Finalmente, la relevancia clínica de estos resultados quedo probada por la asociación, en muestras tumorales de pacientes con cáncer de colon, entre la expresión de SNAI1 en el compartimento estromal y los marcadores de angiogénesis.

2.1. DINÁMICA DE LA MEC MEDIADA POR PDGF-BB

Los fibroblastos activos son el principal componente en el microambiente tumoral (Bremnes et al., 2011). Como ya se ha comentado en la introducción, estos fibroblastos, denominados CAFs, son una población heterogénea de fibroblastos en estado de activación y con capacidad para promover el crecimiento y la progresión tumoral, favoreciendo una variedad de mecanismos específicos (Herrera et al. 2013; Räsänen & Vaheri 2010). Por otro lado, los ligandos de PDGF (del inglés, *Platelet-Derived Growth Factor*) estimulan el reclutamiento de los CAFs hacia el estroma tumoral donde participan como importantes reguladores de este tipo celular (Paulsson et al., 2014). En este sentido, se ha demostrado que la señalización mediada por el receptor PDGFR- β ejerce efectos pro-metastásicos en diferentes modelos de cáncer, y su papel pronóstico se ha observado en diferentes tipos tumorales (Paulsson et al., 2014). En paralelo, existen estudios que prueban que fibroblastos tratados con PDGF-BB presentan un aumento en la síntesis de proteínas de la MEC, como el Hialuronano (HA) (Li et al., 2007), la Fibronectina ED-A y el Colágeno I (Rajkumar et al., 2006). La dinámica de la MEC comprende cambios en la cantidad, composición o topografía de las fibras, que puede dar lugar a una desordenación y desregulación de sus propiedades esenciales llevando a comportamientos anormales de las células en los tejidos tumorales (Cox y Erler, 2011; Keely, 2011; Stanisavljevic et al., 2015).

De acuerdo con estos datos, en este trabajo demostramos que los fibroblastos BJ-hTERT presentaban una alineación paralela cuando eran tratados con PDGF-BB, lo cual resultaba en un aumento en la deposición y en una organización anisotrópica de las fibras de la MEC, tanto de Colágeno I como de FN1. Estos cambios en las propiedades de la MEC también se validaron usando NFs y CAFs aislados a partir de muestras tumorales derivadas de pacientes con cáncer colorrectal. Como cabía esperar por su fenotipo activado, los CAFs presentaron un comportamiento similar a los fibroblastos tratados con PDGF-BB ya que daban lugar a matrices densas con alto grado de organización de las fibras, en comparación con las matrices de los NFs. Sin Embargo, los CAFs estimulados con PDGF-BB revelaron aún una mayor alineación en las fibras de la MEC al compararlos con los CAFs no tratados con el ligando.

2.2. PAPEL DE UNA MEC ORDENADA EN EL PROCESO ANGIOGÉNICO

La formación de nuevos vasos sanguíneos es un paso esencial para afrontar la eliminación de desechos y la demanda creciente de nutrientes y oxígeno que se dan durante el crecimiento tumoral (Davis y Senger, 2005). Los componentes de la MEC controlan la actividad de las células endoteliales, como la supervivencia celular, la proliferación, la formación del lumen del vaso (Newman et al., 2011), la tubulogénesis (Davis y Senger, 2005), y sirven de carriles para guiar la migración y ramificación endotelial (Sweet et al., 2012). A pesar de estas funciones ya conocidas de la MEC, la relación entre la organización de las fibras de la MEC y el proceso angiogénico aún no se ha estudiado en detalle. En este trabajo describimos que los fibroblastos activos por el factor PDGF-BB estimulan la producción de MECs con fibras proteicas ordenadas de forma paralela y que, dicha ordenación, favorece la activación de las células endoteliales y guía la formación de estructuras tubulares semejantes a capilares. Cabe destacar que el tratamiento con PDGF-BB dio lugar a un incremento en la ordenación de las fibras, tanto de Colágeno I como de FN1, sin embargo, el incremento en la deposición del Colágeno I fue mayor que el observado en la FN1. De acuerdo con esto, el tratamiento de los fibroblastos con el inhibidor de LOX, responsable del entrecruzamiento del colágeno, afectó negativamente tanto a la deposición como a la ordenación de las fibras de Colágeno I, mientras que ninguno de los dos parámetros fue modificado en el caso de la FN1. Además, el proceso de tubulogénesis no se observó en células endoteliales sembradas en matrices derivadas de fibroblastos estimulados con PDGF-BB y tratadas a la vez con el inhibidor de LOX. De esta forma, la importancia de la ordenación de las fibras de Colágeno I en la activación y morfogénesis endotelial queda demostrada. Sin embargo, ni los fibroblastos que fueron estimulados con el factor PDGF-BB, ni aquellos que fueron tratados con el inhibidor de LOX, mostraron cambios en la expresión de la proteína LOX, lo que sugiere que otra proteína debe estar mediando, en nuestro modelo con PDGF-BB, el proceso de ordenación de las fibras de la MEC y, por tanto, la morfogénesis endotelial. Apoyando estos resultados, se ha descrito que el Colágeno I actúa como un potente inductor pro-vascular, estimulando la morfogénesis tubular en matrices 3D con un alto grado de rigidez y donde el remodelado de las fibras de la MEC genera una red de carriles que favorecen la migración celular (Davis et al., 2011; Keely, 2011). De forma adicional, nuestros datos demuestran que los fibroblastos tratados con PDGF-BB y embebidos en geles de Colágeno I generaron una matriz más rígida, como demuestra su alta capacidad de contracción, que favorecía la invasión de las células endoteliales.

2.3. PAPEL DEL EJE PDGF-BB/FAK/SNAI1 EN LA ACTIVACIÓN ENDOTELIAL MEDIADA POR LA MEC

Los factores de crecimiento, como PDGF-BB, fosforilan los receptores tirosina quinasas, lo que a su vez resulta en la activación de tres rutas clásicas de señalización que se encuentran mutadas frecuentemente en tumores: la GTPasa pequeña Ras, la fosfatidil inositol 3'-quinasa PI3K (del inglés, *Phosphatidylinositol 3'-Kinase*) y la quinasa de adhesión focal FAK (del inglés, *Focal Adhesion Kinase*) (Shaw y Cantley, 2006; Frame et al., 2010; Chen et al., 2011; Jung et al., 2012; Heldin, 2013). En nuestro estudio, el inhibidor de PI3K/Akt revirtió completamente la deposición de Colágeno I mediada por PDGF-BB, mientras que los inhibidores de ERK y FAK sólo lograron revertir su deposición de forma parcial. Sin embargo, al analizar la organización de las fibras de la MEC, FAK mostró ser una proteína esencial en la regulación de la dinámica de la MEC mediada por PDGF-BB ya que, al inhibir la ruta, los fibroblastos crecieron de forma desorganizada y las fibras se depositaron de forma aleatoria. Además, el proceso de formación de túbulos se inhibió completamente en las matrices 3D de los fibroblastos tratados con el inhibidor de FAK. De acuerdo con estos resultados, se ha visto que la supervivencia de las células endoteliales está mediada por FAK (Hood et al., 2003) y que, además, FAK es una proteínas que se encuentra desregulada en varios tipos de carcinomas, incluyendo el cáncer de colon (Matkowskyj et al., 2003).

Por otra parte, SNAI1 es un factor transcripcional iniciador de la EMT, un proceso que se observa en distintos tipos de tumores (Herrera et al., 2015). En fibroblastos, PDGF-BB promueve un fenotipo activado donde SNAI1 actúa como regulador principal de la expresión génica y las propiedades funcionales de este tipo celular (Rowe et al., 2009; Lu et al., 2013). En la primera parte del trabajo, presentamos a SNAI1 como un marcador de fibroblastos activos, cuya expresión estimula la producción de moléculas solubles con capacidad para inducir migración de las células de cáncer de colon. Además, como ya se ha mencionado anteriormente, la expresión de SNAI1 en los fibroblastos predice una peor supervivencia en pacientes con cáncer de colon (Francí et al., 2009). De forma adicional, es destacable el importante papel de SNAI1 en la composición de la MEC, afectando tanto a la deposición como al alineamiento de las fibras de colágeno y FN1. Asimismo, la estabilidad de SNAI1 puede venir dada, a su vez, por la unión del colágeno I al receptor DDR2, generándose una MEC más rígida y ordenada (Stanisavljevic et al., 2011, 2015; Zhang et al., 2013; Xie et al., 2015).

Sin embargo, a pesar de los estudios anteriores, las rutas moleculares moduladas por SNAI1 en fibroblastos no se han definido con detalle, y no se ha propuesto ninguna relación entre la actividad del factor de transcripción y el control de la angiogénesis mediado por cambios en las propiedades físicas de la MEC. En el trabajo actual, demostramos que el tratamiento de fibroblastos

y/o CAFs con PDGF-BB aumenta los niveles de expresión de SNAI1 y su translocación al núcleo, donde ejerce su función activando o reprimiendo genes. La depleción de SNAI1 en fibroblastos resultó en una menor organización tanto de las propias células como de las fibras de la MEC, en comparación con los fibroblastos salvajes tratados con PDGF-BB. De hecho, aquellos CAFs en los que se observó una respuesta más evidente al ligando, generaron matrices 3D con mayor ordenación anisotrópica de las fibras, junto con un aumento de la expresión de SNAI1. Además, las células endoteliales sembradas en matrices 3D generadas a partir de fibroblastos *Snai1* (-/-), no formaron estructuras similares a capilares y revelaron un descenso en la expresión de los marcadores de activación angiogénica independientemente de la estimulación con PDGF-BB. Apoyando estos datos, existen evidencias que demuestran la asociación entre SNAI1 y la angiogénesis en modelos murinos (Lomelí et al., 2009; Park et al., 2015).

Asimismo, aunque la inhibición, tanto de PI3K/Akt como de FAK, regularon negativamente la expresión de la proteína del citoesqueleto α -SMA, sólo el segundo fue capaz de inhibir completamente la expresión de SNAI1. De hecho, la inhibición de FAK en los fibroblastos, reveló un patrón en las fibras de la MEC y un efecto sobre la morfogénesis tubular, similar al observado tanto en las matrices derivadas de fibroblastos SNAI1 (-/-) como en aquellas tratadas con BAPN. Estos datos sugieren que el eje de señalización PDGF-BB/FAK/SNAI1 está regulando la morfología celular y guiando así el alineamiento de las fibras que sirven de carriles o vías para el proceso de formación de estructuras tubulares. Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados en la alineación de las fibras de la MEC mediados por SNAI1 no han sido descifrados completamente.

Basándonos en trabajos publicados previamente y en los resultados aquí presentados, proponemos a PDGF-BB como un inductor de la expresión de SNAI1 y regulador de la estabilidad de la proteína a través de las rutas de PI3K/Akt, ERK y FAK. Aunque la vida media de la proteína SNAI1 está regulada por PI3K/Akt y GSK3- β , en ausencia de FAK no se produce la activación de la ruta de Akt ni se da la expresión de SNAI1 (Li et al., 2011). Además, se ha demostrado que SNAI1 se une al promotor de la *FN1* y puede actuar como un regulador importante de α -SMA y de la formación de las fibras de estrés (Stanisavljevic et al., 2011, 2015). Por tanto, en un bucle teórico, las fibras alineadas resultantes de la fibrillogénesis de la FN1 actuarían como molde para el ensamblaje de otras moléculas de la MEC, como el Colágeno I, resultante del entrecruzamiento mediado por LOX y que, a su vez, se une al receptor de colágeno DDR2 llevando a la estabilización de SNAI1 y mayor producción del mismo (Zhang et al., 2013; Stanisavljevic et al., 2015).

Como se comentó en el apartado de Introducción, durante el proceso de angiogénesis, la célula endotelial “*tip cell*”, invade a través de la membrana basal del capilar, seguida de células

adyacentes o “stalk cells” que proliferan y colaboran en la formación del nuevo brote vascular (Gerhardt et al., 2003). Este proceso se ha asociado con una migración de tipo colectivo (Arima et al., 2011). En el presente trabajo, demostramos que los fibroblastos salvajes, que presentan expresión de SNAI1 y han sido tratados con PDGF-BB, generan matrices 3D más ordenadas que favorecen la proliferación de las células endoteliales. Además, estos fibroblastos presentan una gran capacidad de contracción cuando son embebidos en geles de Colágeno I, dando lugar a una matriz rígida que estimula la invasión colectiva en cohorte de las células endoteliales. Estos datos junto con los experimentos de formación de túbulos confirman, por tanto, la influencia de un microambiente con fibroblastos activos en las distintas etapas del proceso angiogénico y la activación endotelial. A pesar de los resultados aquí presentados y de otras publicaciones previas, las rutas moleculares y la regulación espacio-temporal de la morfogénesis endotelial siguen siendo, en gran parte, desconocidas.

Por último, el significado *in vivo* del presente estudio queda patente al analizar las muestras humanas de pacientes con cáncer de colon que revelaron una asociación directa entre la expresión de SNAI1 en el compartimento estromal y el marcador de angiogénesis CD34. Aunque estos análisis deben ampliarse a series con mayor número de pacientes con el fin de confirmar esta relación, la mayor presencia de vasos sanguíneos en aquellos tumores con mayores niveles de SNAI1, apoyan los efectos biológicos de los fibroblastos con expresión del factor en la activación endotelial.

2.4. CONSIDERACIONES FINALES

En resumen en este estudio se demuestra el papel del ligando PDGF-BB en la activación de las células endoteliales y por tanto del proceso angiogénico a través del remodelado de la MEC mediado por la expresión de SNAI1 y la vía de señalización FAK en fibroblastos. Varios estudios experimentales han demostrado que el bloqueo de PDGFR- β en pericitos afecta de forma negativa a la angiogénesis del tumor (Levéen et al., 1994; Lindahl et al., 1997). Por otra parte, existe cierta controversia sobre la función de la expresión del receptor en la propia células endotelial. Nosotros no observamos expresión de PDGFR- β en las células HUVECs cultivadas en presencia del ligando, PDGF-BB, ni tampoco al realizar el co-cultivo con los fibroblastos. Nuestros resultados están en línea con un estudio previo realizado utilizando ratones con expresión nula de PDGFR- β , donde no se encontraron evidencias de su posible papel en la regulación de la actividad endotelial (Andrae et al., 2008). Es plausible que en los fibroblastos SNAI1 esté actuando como mediador de la activación del receptor PDGFR- β , en respuesta a su ligando, y la activación de las células endoteliales del tumor, estableciendo una posible explicación a las funciones de PDGF-BB en la activación endotelial.

3. POTENCIAL DE APLICABILIDAD

La investigación biomédica es imprescindible para la generación de conocimiento científico-técnico sobre los procesos celulares y moleculares. Esta constante innovación produce un flujo de nuevos datos y conceptos que, de forma específica, conllevan su propia capacidad de aplicación y valor clínico.

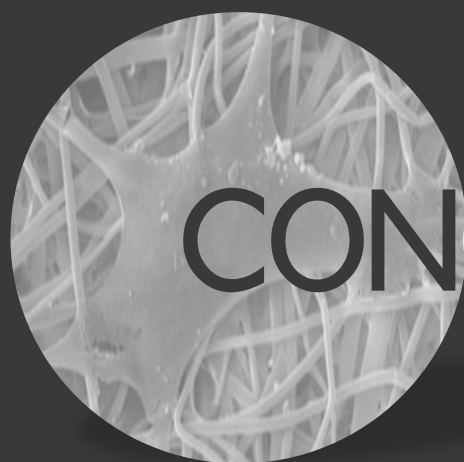
En este contexto, este estudio, mediante sus dos objetivos principales, define la expresión estromal de SNAI1 como un indicador de una mayor agresividad de los tumores, dada la capacidad de la proteína para estimular la migración, invasión, proliferación y angiogénesis del tumor en pacientes con CCR. En líneas generales, el interés aplicado de estos resultados se basa en que podemos obtener datos sobre el comportamiento de los carcinomas de colon, utilizando factores moleculares no específicos de sus células tumorales y por tanto menos mutables.

El primer grupo de resultados establece una asociación entre la expresión de SNAI1 y los marcadores de fibroblastos activos, todos ellos sobreexpresados en CAFs de pacientes con CCR sugiriendo así la utilidad del análisis de SNAI1 como nuevo marcador de fibroblastos activos. Además, observamos que fibroblastos expresando SNAI1 estimulan tanto la migración y proliferación de células tumorales in vitro como el crecimiento del tumor y la invasión hacia capas subyacentes en un modelo de tumor subcutáneo en ratones. Es resaltable que estos procesos se encuentran mediados, al menos en parte, por la regulación que ejerce SNAI1 sobre el perfil de citoquinas liberadas al medio extracelular por los fibroblastos, entre las que destacamos el papel de MCP-3. Estos resultados enfatizan la necesidad de elucidar la comunicación entre los fibroblastos y las células tumorales, así como de identificar las posibles citoquinas implicadas. Además, el bloqueo de las interacciones entre los fibroblastos y las células epiteliales se presenta como una estrategia de gran potencial para frenar la progresión del cáncer, fomentando la búsqueda de nuevas terapias con efectos sinérgicos a las terapias sistémicas actuales.

El segundo grupo de resultados indica una asociación más compleja entre la expresión de SNAI1 en fibroblastos activados por PDGF-BB, la vía de señalización FAK, el remodelado de la MEC y la angiogénesis del tumor. Así, los experimentos realizados in vitro demuestran que la activación de fibroblastos con PDGF-BB favorece la producción de MEC con organización anisotrópica de las fibras que la componen lo que favorece la activación y morfogénesis endotelial. Este proceso se encuentra mediado por la vía de señalización FAK y la expresión de SNAI1 en fibroblastos. Además, mediante cultivos primarios de NFs y CAFs humanos evidenciamos el papel de PDGF-BB en la ordenación de la MEC y resaltamos el valor clínico de estos resultados estableciendo la asociación

entre el marcador SNAI1 y la angiogénesis del tumor en muestras de pacientes con CCR. El papel de PDGF-BB como posible diana terapéutica para inhibir el crecimiento vascular del tumor, se ha testado en pacientes con distintos tipos de tumores. Estas aproximaciones han tenido cierto éxito terapéutico sobre la angiogénesis tumoral en varios modelos preclínicos, sin embargo, no han dado el resultado esperado en ensayos clínicos con pacientes. La heterogeneidad observada en la respuesta al tratamiento de pacientes con cáncer, podría ser reflejo de los cambios en la expresión génica de los mediadores angiogénicos. En este sentido, el análisis de la expresión de SNAI1 en los fibroblastos del estroma tumoral podría usarse como potencial biomarcador para la identificación de aquellos sub-grupos de pacientes con mejor respuesta a estas terapias y, por tanto, mejorar de esta forma los tratamientos personalizados.

Los avances en el conocimiento de la biología del cáncer muestran que el crecimiento y progresión del tumor dependen de la alteración de una compleja red de diferentes vías de señalización. En los últimos años, se han dedicado grandes esfuerzos al desarrollo de terapias dirigidas para el tratamiento del cáncer. Cada vez parece más claro que se van a necesitar pautas terapéuticas que combinen varios compuestos con el fin de inhibir simultáneamente diferentes rutas de señalización alteradas en cáncer, manteniendo la toxicidad dentro de los límites aceptables. Por tanto, aunque en este trabajo no se ha analizado la influencia que la ruta de SNAI1 pueden tener sobre el tratamiento, ni se ha explorado qué oportunidad ofrecería la inhibición de alguna de estas funciones de los fibroblastos como estrategia terapéutica en los pacientes, es razonable considerar que, al margen de los tratamientos citotóxicos y citostáticos contra la célula tumoral, una actuación sobre el estroma o espacio celular normal de los tumores podría tener un efecto aditivo o sinérgico con el tratamiento antitumoral hoy disponible. En este sentido consideramos que este trabajo aporta resultados que pueden abrir nuevas líneas de investigación dirigidas al control, con finalidad terapéutica, de algunos de los fenómenos descritos.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1. La expresión de SNAI1 en fibroblastos estimula la migración y la proliferación de células de cáncer colorrectal de forma paracrina en parte mediante la liberación al medio extracelular de la citoquina MCP-3.**

Hallazgos concretos:

- 1.1. Los niveles de expresión de SNAI1 se encuentran sobre-expresados en CAFs respecto a NFs y sus niveles se asocian a la expresión de marcadores de fibroblastos activos. Por tanto, proponemos a SNAI1 como marcador de fibroblasto activo.
- 1.2. El efecto pro-migratorio y proliferativo de CAFs primarios de diferentes pacientes sobre las células tumorales de colon es dependiente de la expresión de SNAI1 en dichos fibroblastos.
- 1.3. En líneas celulares la expresión de SNAI1 en fibroblastos regula de forma paracrina la migración y proliferación de células epiteliales de cáncer de colon.
- 1.4. La depleción de SNAI1 en fibroblastos retrasa el crecimiento tumoral e impide la invasión de las células tumorales a capas musculares en un modelo murino de tumores de colon subcutáneos.
- 1.5. La expresión de SNAI1 modifica el perfil de expresión de citoquinas secretadas al medio extracelular en fibroblastos.
- 1.6. La citoquina MCP-3 participa en la regulación de los efectos pro-migratorios en células tumorales de cáncer colorrectal mediados por la expresión de SNAI1 en fibroblastos.
- 1.7. La expresión de SNAI1 y de MCP-3 se asocian de forma directa en muestras tumorales de pacientes con cáncer de colon.

- 2. El factor de crecimiento PDGF-BB condiciona el remodelado de la matriz extracelular (MEC) por los fibroblastos mediante el eje de señalización FAK/SNAI1. Estos cambios en la matriz favorecen la activación y morfogénesis de células endoteliales.**

Hallazgos concretos:

- 2.1. Los fibroblastos estimulados con PDGF-BB presentan un crecimiento anisotrópico generando una mayor deposición de proteínas de la MEC.

- 2.2. La MEC derivada de fibroblastos estimulados con PDGF-BB presenta un incremento en la cantidad de fibras de Colágeno I y FN1 exhibiendo estas además una disposición más ordenada/paralela.
- 2.3. Las MECs derivadas de fibroblastos estimulados con PDGF-BB estimulan la activación de células endoteliales y formación de estructuras similares a capilares de forma dependiente de la ordenación de las fibras de Colágeno I.
- 2.4. La vía de señalización FAK, así como la expresión de SNAI1 en fibroblastos median el crecimiento alineado de los fibroblastos y el remodelado de la matriz por estos y, así, la activación de células endoteliales y el inicio del proceso angiogénico *in vitro*.
- 2.5. La expresión de SNAI1 en fibroblastos regula, a través de los cambios derivados en la MEC, la proliferación e invasión de células endoteliales, procesos relacionados directamente con la angiogénesis.
- 2.6. El remodelado de la MEC por fibroblastos tratados con PDGF-BB y dependiente de la expresión de SNAI1, también se observa en fibroblastos primarios asociados a tumores de colon humano.
- 2.7. Los niveles de expresión de SNAI1 en fibroblastos se asocian con marcadores de angiogénesis tumoral en muestras tumorales de pacientes con cáncer de colon.



BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

- Abajo, A., Bitarte, N., Zarate, R., Boni, V., Lopez, I., Gonzalez-Huarriz, M., Rodriguez, J., Bandres, E. y Garcia-Foncillas, J. (2012) «Identification of colorectal cancer metastasis markers by an angiogenesis-related cytokine-antibody array.» *World journal of gastroenterology*, 18(7) pp. 637-45.
- Abramsson, A., Lindblom, P. y Betsholtz, C. (2003) «Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors». *Journal of Clinical Investigation*, 112(8) pp. 1142-1151.
- Ahlquist, D. A., Harrington, J. J., Burgart, L. J. y Roche, P. C. (2000) «Morphometric analysis of the “mucocellular layer” overlying colorectal cancer and normal mucosa: relevance to exfoliation and stool screening.» *Human pathology*, 31(1) pp. 51-57.
- Alba-Castellón, L., Batlle, R., Francí, C., Fernández-Aceñero, M. J., Mazzolini, R., Peña, R., Loubat, J., Alameda, F., Rodríguez, R., Curto, J., Albanell, J., Muñoz, A., Bonilla, F., Ignacio Casal, J., Rojo, F. y García de Herreros, A. (2014) «Snai1 Expression Is Required for Sarcomagenesis». *Neoplasia*, 16(5) pp. 413-421.
- Alberga, a, Boulay, J. L., Kempe, E., Dennefeld, C. y Haenlin, M. (1991) «The snail gene required for mesoderm formation in Drosophila is expressed dynamically in derivatives of all three germ layers.» *Development*, 111(4) pp. 983-992.
- Allen, M. y Louise Jones, J. (2011) «Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer.» *The Journal of pathology*, 223(2) pp. 162-76.
- Alves, C. C., Rosivatz, E., Schott, C., Hollweck, R., Becker, I., Sarbia, M., Carneiro, F. y Becker, K.-F. (2007) «Slug is overexpressed in gastric carcinomas and may act synergistically with SIP1 and Snail in the down-regulation of E-cadherin». *The Journal of Pathology*, 211(5) pp. 507-515.
- Andrae, J., Gallini, R. y Betsholtz, C. (2008) «Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine». *Genes & Development*, 22(10) pp. 1276-1312.
- Annibale, B., Capurso, G., Chistolini, a, D’Ambra, G., DiGiulio, E., Monarca, B. y DelleFave, G. (2001) «Gastrointestinal causes of refractory iron deficiency anemia in patients without gastrointestinal symptoms.» *The American journal of medicine*, 111(6) pp. 439-45.
- Arima, S., Nishiyama, K., Ko, T., Arima, Y., Hakozaiki, Y., Sugihara, K., Koseki, H., Uchijima, Y., Kurihara, Y. y Kurihara, H. (2011) «Angiogenic morphogenesis driven by dynamic and heterogeneous collective endothelial cell movement.» *Development*, 138(21) pp. 4763-76.
- Augsten, M., Hagglof, C., Pena, C. y Ostman, A. (2010) «A digest on the role of the tumor microenvironment in gastrointestinal cancers». *Cancer Microenviron*, 3(1) pp. 167-176.

- Avraamides, C. J., Avraamides, C. J., Garmy-Susini, B., Garmy-Susini, B., Varner, J. a y Varner, J. a (2008) «Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis.» *Nature reviews. Cancer*, 8(8) pp. 604-617.
- Balkwill, F. y Mantovani, A. (2001) «Inflammation and cancer: Back to Virchow?» *Lancet* pp. 539-545.
- Barker, H. E., Chang, J., Cox, T. R., Lang, G., Bird, D., Nicolau, M., Evans, H. R., Gartland, A. y Erler, J. T. (2011) «LOXL2-mediated matrix remodeling in metastasis and mammary gland involution». *Cancer Research*, 71(5) pp. 1561-1572.
- Barrallo-Gimeno, A. y Nieto, M. A. (2005) «The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer.» *Development*, 132(14) pp. 3151-3161.
- Batlle, R., Alba-Castellón, L., Loubat-Casanovas, J., Armenteros, E., Francí, C., Stanisavljevic, J., Banderas, R., Martin-Caballero, J., Bonilla, F., Baulida, J., Casal, J. I., Gridley, T. y García de Herreros, A. (2013) «Snai1 controls TGF- β responsiveness and differentiation of mesenchymal stem cells.» *Oncogene*, 32(28) pp. 3381-3389.
- Baulida, J. y García de Herreros, A. (2015) «Snai1-driven plasticity of epithelial and mesenchymal cells sustains cancer malignancy». *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* pp. 55-61.
- Beacham, D. A. y Cukierman, E. (2005) «Stromagenesis: The changing face of fibroblastic microenvironments during tumor progression». *Seminars in cancer biology*, 15(5) pp. 329-341.
- Bergers, G. y Benjamin, L. E. (2003) «Tumorigenesis and the angiogenic switch.» *Nature reviews. Cancer*, 3(6) pp. 401-410.
- Bhowmick, N. A., Neilson, E. G. y Moses, H. L. (2004) «Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression.» *Nature*, 432(7015) pp. 332-337.
- Bignon, M., Pichol-Thievend, C., Hardouin, J., Malbouyres, M., Bréchet, N., Nasciutti, L., Barret, A., Teillon, J., Guillon, E., Etienne, E., Caron, M., Joubert-Caron, R., Monnot, C., Ruggiero, F., Muller, L. y Germain, S. (2011) «Lysyl oxidase-like protein-2 regulates sprouting angiogenesis and type IV collagen assembly in the endothelial basement membrane». *Blood*, 118(14) pp. 3979-3989.
- Bissell, M. J., Hall, H. G. y Parry, G. (1982) «How does the extracellular matrix direct gene expression?» *Journal of Theoretical Biology*, 99(1) pp. 31-68.
- Blanco, M. J., Moreno-bueno, G., Sarrio, D., Locascio, A., Cano, A., Palacios, J., Nieto, M. A., Palacios, A. y Nieto, M. A. (2002) «Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas». *Oncogene*, 21(20) pp. 3241-3246.
- Board, R. y Jayson, G. C. (2005) «Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR): a target for

- anticancer therapeutics.» *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 8(1-2) pp. 75-83.
- Boland, C. R. y Goel, A. (2010) «Microsatellite Instability in Colorectal Cancer». *Gastroenterology*, 138(6) pp. 2073-2087.
- Bourdoulous, S., Orend, G., MacKenna, D. A., Pasqualini, R. y Ruoslahti, E. (1998) «Fibronectin matrix regulates activation of RHO and CDC42 GTPases and cell cycle progression». *Journal of Cell Biology*, 143(1) pp. 267-276.
- Bremnes, R. M., Dønnem, T., Al-Saad, S., Al-Shibli, K., Andersen, S., Sirera, R., Camps, C., Martinez, I. y Busund, L.-T. (2011) «The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer.» *Journal of thoracic oncology*, 6(1) pp. 209-17.
- Brenner, H., Kloor, M. y Pox, C. P. (2014) «Colorectal cancer.» *Lancet*, 383(9927) pp. 1490-1502.
- Bruyere, F., Namdarian, B., Corcoran, N. M., Pedersen, J., Ockrim, J., Voelzke, B. B., Mete, U., Costello, A. J. y Hovens, C. M. (2010) «Snail expression is an independent predictor of tumor recurrence in superficial bladder cancers». *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 28(6) pp. 591-596.
- Calvo, F., Ege, N., Grande-Garcia, A., Hooper, S., Jenkins, R. P., Chaudhry, S. I., Harrington, K., Williamson, P., Moeendarbary, E., Charras, G. y Sahai, E. (2013) «Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts». *Nat Cell Biol*, 15(6) pp. 637-646.
- Cano, a, Pérez-Moreno, M. a, Rodrigo, I., Locascio, a, Blanco, M. J., del Barrio, M. G., Portillo, F. y Nieto, M. a (2000) «The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression.» *Nature cell biology*, 2(2) pp. 76-83.
- Castelló-Cros, R. y Cukierman, E. (2009) «Stromagenesis during tumorigenesis: characterization of tumor-associated fibroblasts and stroma-derived 3D matrices.» *Methods in molecular biology*, 522, enero, pp. 275-305.
- Chan, D. S. M., Lau, R., Aune, D., Vieira, R., Greenwood, D. C., Kampman, E. y Norat, T. (2011) «Red and processed meat and colorectal cancer incidence: Meta-analysis of prospective studies». *PLoS ONE*, 6(6).
- Chen, S. Y., Shiau, A. L., Li, Y. T., Lin, C. C., Jou, I. M., Liu, M. F., Wu, C. L. y Wang, C. R. (2015) «Transcription factor snail regulates tumor necrosis factor α -mediated synovial fibroblast activation in the rheumatoid joint». *Arthritis and Rheumatology*, 67(1) pp. 39-50.
- Chen, T.-H., Chan, P.-C., Chen, C.-L. y Chen, H.-C. (2011) «Phosphorylation of focal adhesion kinase on tyrosine 194 by Met leads to its activation through relief of autoinhibition.» *Oncogene*, 30(2) pp. 153-66.

- Chen, W.-J., Ho, C.-C., Chang, Y.-L., Chen, H.-Y. H.-W., Lin, C.-A. C.-Y., Ling, T.-Y., Yu, S.-L., Yuan, S.-S., Chen, Y.-J. L., Lin, C.-A. C.-Y., Pan, S.-H., Chou, H.-Y. E., Chen, Y.-J. L., Chang, G.-C., Chu, W.-C., Lee, Y.-M., Lee, J.-Y., Lee, P.-J., Li, K.-C., Chen, H.-Y. H.-W. y Yang, P.-C. (2014) «Cancer-associated fibroblasts regulate the plasticity of lung cancer stemness via paracrine signalling.» *Nature communications*, 5 p. 3472.
- Christofori, G. (2003) «Changing neighbours, changing behaviour: cell adhesion molecule-mediated signalling during tumour progression.» *EMBO Journal*, 22(10) pp. 2318-23.
- Cox, T. R. y Erler, J. T. (2011) «Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer.» *Disease models & mechanisms*, 4(2) pp. 165-78.
- Davis, G. E. y Senger, D. R. (2005) «Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization.» *Circulation research*, 97(11) pp. 1093-1107.
- Davis, G. E., Stratman, A. N., Sacharidou, A. y Koh, W. (2011) «Molecular basis for endothelial lumen formation and tubulogenesis during vasculogenesis and angiogenic sprouting.» *International review of cell and molecular biology*, 288, pp. 101-165.
- De Wever, O., Van Bockstal, M., Mareel, M., Hendrix, A. y Bracke, M. (2014) «Carcinoma-associated fibroblasts provide operational flexibility in metastasis.» *Seminars in cancer biology*, 25, abril, pp. 33-46.
- Dickinson, B. T., Kisiel, J., Ahlquist, D. a y Grady, W. M. (2015) «Molecular markers for colorectal cancer screening.» *Gut*, 64(9) pp. 1485-94.
- DiMeo, T. A., Anderson, K., Phadke, P., Fan, C., Feng, C., Perou, C. M., Naber, S. y Kuperwasser, C. (2009) «A novel lung metastasis signature links Wnt signaling with cancer cell self-renewal and epithelial-mesenchymal transition in basal-like breast cancer.» *Cancer research*, 69(13) pp. 5364-73.
- Di Nicolantonio, F., Martini, M., Molinari, F., Sartore-Bianchi, A., Arena, S., Saletti, P., De Dosso, S., Mazzucchelli, L., Frattini, M., Siena, S. y Bardelli, A. (2008) «Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer.» *Journal of Clinical Oncology*, 26(35) pp. 5705-5712.
- Duffy, M. J., van Dalen, A., Haglund, C., Hansson, L., Klapdor, R., Lamerz, R., Nilsson, O., Sturgeon, C. y Topolcan, O. (2003) «Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines.» *European journal of cancer*, 39(6) pp. 718-727.
- DuFort, C. C., Paszek, M. J. y Weaver, V. M. (2011) «Balancing forces: architectural control of mechanotransduction.» *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(5) pp. 308-319.
- Dvorak, H. F. (1986) «Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma

- generation and wound healing.» *The New England journal of medicine*, 315(26) pp. 1650-1659.
- Egeblad, M., Rasch, M. G. y Weaver, V. M. (2010) «Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution». *Current Opinion in Cell Biology* pp. 697-706.
- Elloul, S., Elstrand, M. B., Nesland, J. M., Tropé, C. G., Kvalheim, G., Goldberg, I., Reich, R. y Davidson, B. (2005) «Snail, slug, and smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma». *Cancer*, 103(8) pp. 1631-1643.
- Emadi Baygi, M., Soheili, Z. S., Schmitz, I., Sameie, S. y Schulz, W. A. (2010) «Snail regulates cell survival and inhibits cellular senescence in human metastatic prostate cancer cell lines». *Cell Biology and Toxicology*, 26(6) pp. 553-567.
- Fearon, E. y Bommer, G. (2008) «Molecular biology of colorectal cancer». En Vincent T. DeVita, Theodore S. Lawrence, S. A. R. (ed.) *Principles & Practice of Oncology, Volumen 1*. Lippincott, Philadelphia, pp. 1218-1231.
- Fearon, E. R. (2011) «Molecular genetics of colorectal cancer.» *Annual review of pathology*, 6(1) pp. 479-507.
- Fedirko, V., Tramacere, I., Bagnardi, V., Rota, M., Scotti, L., Islami, F., Negri, E., Straif, K., Romieu, I., La Vecchia, C., Boffetta, P. y Jenab, M. (2011) «Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies». *Ann Oncol*, 22(9) pp. 1958-1972.
- Frame, M. C., Patel, H., Serrels, B., Lietha, D. y Eck, M. J. (2010) «The FERM domain: organizing the structure and function of FAK.» *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(11) pp. 802-814.
- Francí, C., Gallén, M., Alameda, F., Baró, T., Iglesias, M., Virtanen, I. y García de Herreros, A. (2009) «Snai1 protein in the stroma as a new putative prognosis marker for colon tumours.» *PLoS ONE*, 4(5) p. e5595.
- Francí, C., Takkunen, M., Dave, N., Alameda, F., Gómez, S., Rodríguez, R., Escrivà, M., Montserrat-Sentís, B., Baró, T., Garrido, M., Bonilla, F., Virtanen, I. y García de Herreros, A. (2006) «Expression of Snail protein in tumor-stroma interface.» *Oncogene*, 25(37) pp. 5134-5144.
- Franco, D. L., Mainez, J., Vega, S., Sancho, P., Murillo, M. M., de Frutos, C. A., Del Castillo, G., López-Blau, C., Fabregat, I. y Nieto, M. A. (2010) «Snai1 suppresses TGF-beta-induced apoptosis and is sufficient to trigger EMT in hepatocytes.» *Journal of cell science*, 123(Pt 20) pp. 3467-3477.
- Frings, O., Augsten, M., Tobin, N. P., Carlson, J., Paulsson, J., Pena, C., Olsson, E., Veerla, S., Bergh, J., Stman, A. y Sonnhhammer, E. L. L. (2013) «Prognostic significance in breast cancer of a gene signature capturing stromal PDGF signaling». *American Journal of Pathology*, 182(6)

pp. 2037-2047.

- Fu, X.-T., Dai, Z., Song, K., Zhang, Z.-J., Zhou, Z.-J., Zhou, S.-L., Zhao, Y.-M., Xiao, Y.-S., Sun, Q.-M., Ding, Z.-B. y Fan, J. (2015) «Macrophage-secreted IL-8 induces epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells by activating the JAK2/STAT3/Snail pathway». *International Journal of Oncology*, 46(2) pp. 587-596.
- Furuhashi, M., Sjoblom, T., Abramsson, A., Ellingsen, J., Micke, P., Li, H., Bergsten-Folestad, E., Eriksson, U., Heuchel, R., Betsholtz, C., Heldin, C. H. y Ostman, A. (2004) «Platelet-derived growth factor production by B16 melanoma cells leads to increased pericyte abundance in tumors and an associated increase in tumor growth rate». *Cancer Res*, 64(8) pp. 2725-2733.
- Gala, M. y Chung, D. C. (2011) «Hereditary colon cancer syndromes». *Seminars in oncology*, 38(4) pp. 490-499.
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D. y Betsholtz, C. (2003) «VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia.» *The Journal of cell biology*, 161(6) pp. 1163-1177.
- Gomez-Casal, R., Bhattacharya, C., Ganesh, N., Bailey, L., Basse, P., Gibson, M., Epperly, M. y Levina, V. (2013) «Non-small cell lung cancer cells survived ionizing radiation treatment display cancer stem cell and epithelial-mesenchymal transition phenotypes.» *Molecular cancer*, 12(1) p. 94.
- Goss, K. H. y Groden, J. (2000) «Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor.» *Journal of clinical oncology*, 18(9) pp. 1967-1979.
- Gout, S. y Huot, J. (2008) «Role of cancer microenvironment in metastasis: Focus on colon cancer». *Cancer Microenvironment*, 1(1) pp. 69-83.
- Grady, W. M. y Markowitz, S. D. (2008) «TGF- β Signaling Pathway and Tumor Suppression». *En Cold Spring Harbor Monograph Archive; Volume 50 (2008): The TGF- β Family*, pp. 889-937.
- Gregor, D. (1967) «Diagnosis of large-bowel cancer in the asymptomatic patient». *JAMA*, 201(12) pp. 943-945.
- Guaita, S., Puig, I., Francí, C., Garrido, M., Domínguez, D., Batlle, E., Sancho, E., Dedhar, S., De Herreros, A. G. y Baulida, J. (2002) «Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression». *Journal of Biological Chemistry*, 277(42) pp. 39209-39216.
- Guo, Y., Yin, J., Zha, L. y Wang, Z. (2013) «Clinicopathological significance of platelet-derived growth factor B, platelet-derived growth factor receptor- β , and E-cadherin expression in gastric carcinoma.» *Contemporary oncology*, pp. 150-5.
- Hägglöf, C., Hammarsten, P., Josefsson, A., Stattin, P., Paulsson, J., Bergh, A. y Ostman, A. (2010) «Stromal PDGFR β expression in prostate tumors and non-malignant prostate tissue

- predicts prostate cancer survival.» *PLoS One*, 5(5) p. e10747.
- Hanahan, D. y Weinberg, R. A. (2011) «Hallmarks of cancer: the next generation.» *Cell*. Elsevier, 144(5) pp. 646-674.
- Harper, J. y Sainson, R. C. A. (2014) «Regulation of the anti-tumour immune response by cancer-associated fibroblasts.» *Seminars in cancer biology*, 25, abril, pp. 69-77.
- Hay, E. D. (1995) «An overview of epithelio-mesenchymal transformation.» *Acta anatomica*, 154(1) pp. 8-20.
- Heldin, C.-H. (2013) «Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment.» *Cell communication and signaling*. BioMed Central, 11(1) p. 97.
- Heldin, C.-H., Landström, M. y Moustakas, A. (2009) «Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition.» *Current opinion in cell biology*, 21(2) pp. 166-176.
- Hemavathy, K., Hu, X., Ashraf, S. I., Small, S. J. y Ip, Y. T. (2004) «The repressor function of Snail is required for Drosophila gastrulation and is not replaceable by Escargot or Worniu.» *Developmental Biology*, 269(2) pp. 411-420.
- Herrera, A., Herrera, M. y Peña, C. (2015) «The emerging role of Snai1 in the tumor stroma.» *Clinical and Translational Oncology*, diciembre, pp. 1-6.
- Herrera, M., Herrera, A., Domínguez, G., Silva, J., García, V., García, J. M., Gómez, I., Soldevilla, B., Muñoz, C., Provencio, M., Campos-Martin, Y., García de Herreros, A., Casal, I., Bonilla, F. y Peña, C. (2013) «Cancer-associated fibroblast and M2 macrophage markers together predict outcome in colorectal cancer patients.» *Cancer science*, 104(4) pp. 437-44.
- Herrera, M., Herrera, A., Larriba, M. J., Ferrer-Mayorga, G., Herreros, A. G., Bonilla, F., Baulida, J. y Peña, C. (2016) «Colon Cancer-associated Fibroblast Establishment and Culture Growth.» *Bio-protocol*, 6(7).
- Herrera, M., Islam, A. B. M. M. K., Herrera, A., Martín, P., García, V., Silva, J., Garcia, J. M., Salas, C., Casal, I., De Herreros, A. G., Bonilla, F. y Peña, C. (2013) «Functional heterogeneity of cancer-associated fibroblasts from human colon tumors shows specific prognostic gene expression signature.» *Clinical Cancer Research*, 19(21) pp. 5914-5926.
- Hoang, M. V, Whelan, M. C. y Senger, D. R. (2004) «Rho activity critically and selectively regulates endothelial cell organization during angiogenesis.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7) pp. 1874-1879.
- Hocking, D. C., Sottile, J. y Langenbach, K. J. (2000) «Stimulation of integrin-mediated cell contractility by fibronectin.» *Journal of Biological Chemistry*, 275(14) pp. 10673-10682.
- Hollier, B. G., Evans, K. y Mani, S. A. (2009) «The epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells: A coalition against cancer therapies.» *Journal of Mammary Gland Biology and*

Neoplasia, 14(1) pp. 29-43.

Hood, J. D., Frausto, R., Kiosses, W. B., Schwartz, M. A. y Cheresch, D. A. (2003) «Differential alphav integrin-mediated Ras-ERK signaling during two pathways of angiogenesis.» *The Journal of cell biology*, 162(5) pp. 933-943.

Horie, M., Saito, A., Yamaguchi, Y., Ohshima, M. y Nagase, T. (2015) «Three-dimensional Co-culture Model for Tumor-stromal Interaction». *Journal of Visualized Experiments*, (February) pp. 1-7.

Hsu, D. S., Wang, H. J., Tai, S. K., Chou, C. H., Hsieh, C. H., Chiu, P. H., Chen, N. J. y Yang, M. H. (2014) «Acetylation of snail modulates the cytokinome of cancer cells to enhance the recruitment of macrophages». *Cancer Cell*, 26(4) pp. 534-548.

<http://www.seom.org>

Huang, X. Z., Wu, J. F., Ferrando, R., Lee, J. H., Wang, Y. L., Farese, R. V y Sheppard, D. (2000) «Fatal bilateral chylothorax in mice lacking the integrin alpha9beta1.» *Molecular and cellular biology*, 20(14) pp. 5208-15.

Huijbers, I. J., Iravani, M., Popov, S., Robertson, D., Al-Sarraj, S., Jones, C. y Isacke, C. M. (2010) «A role for fibrillar collagen deposition and the collagen internalization receptor endo180 in glioma invasion.» *PLoS ONE*, 5(3) p. e9808.

Hwang, T.-L., Lee, L.-Y., Wang, C.-C., Liang, Y., Huang, S.-F. y Wu, C.-M. (2012) «CCL7 and CCL21 overexpression in gastric cancer is associated with lymph node metastasis and poor prognosis.» *World journal of gastroenterology*, 18(11) pp. 1249-56.

Hwang, W. W.-L., Yang, M.-H. M., Tsai, M. M.-L., Lan, H.-Y. H., Su, S.-H. S., Chang, S.-C. S., Teng, H.-W. H., Yang, S.-H. S., Lan, Y. Y.-T., Chiou, S.-H. S. y Wang, H. H.-W. (2011) «SNAIL regulates interleukin-8 expression, stem cell-like activity, and tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells.» *Gastroenterology*, 141(1) pp. 279-291.

Hynes, R. O. (2002) «Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines». *Cell*, 110(6) pp. 673-687.

Hynes, R. O. (2009) «The extracellular matrix: not just pretty fibrils.» *Science*, 326(5957) pp. 1216-1219.

Ikenouchi, J., Matsuda, M., Furuse, M. y Tsukita, S. (2003) «Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail.» *Journal of cell science*, 116(10) pp. 1959-1967.

Jamora, C., Lee, P., Kocieniewski, P., Azhar, M., Hosokawa, R., Chai, Y. y Fuchs, E. (2005) «A signaling pathway involving TGF-beta2 and snail in hair follicle morphogenesis.» *PLoS biology*, 3(1) p. e11.

Jess, T., Simonsen, J., Jorgensen, K. T., Pedersen, B. V, Nielsen, N. M. y Frisch, M. (2012) «Decreasing risk of colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease over 30 years».

- Gastroenterology*, 143(2) pp. 375-381.
- Jiang, Y., Ben, Q., Shen, H., Lu, W., Zhang, Y. y Zhu, J. (2011) «Diabetes mellitus and incidence and mortality of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of cohort studies». *European journal of epidemiology*, 26(11) pp. 863-876.
- Jouppila-Mättö, A., Tuhkanen, H., Soini, Y., Pukkila, M., Närkiö-Mäkelä, M., Sironen, R., Virtanen, I., Mannermaa, A. y Kosma, V. M. (2011) «Transcription factor snail1 expression and poor survival in pharyngeal squamous cell carcinoma». *Histology and Histopathology*, 26(4) pp. 443-449.
- Jung, D.-W., Che, Z. M., Kim, J., Kim, K., Kim, K.-Y., Williams, D. y Kim, J. (2010) «Tumor-stromal crosstalk in invasion of oral squamous cell carcinoma: a pivotal role of CCL7.» *International journal of cancer*, 127(2) pp. 332-344.
- Jung, O., Choi, S., Jang, S.-B., Lee, S.-A., Lim, S.-T., Choi, Y.-J., Kim, H.-J., Kim, D.-H., Kwak, T. K., Kim, H., Kang, M., Lee, M.-S., Park, S. Y., Ryu, J., Jeong, D., Cheong, H.-K., Kim, H. J., Park, K. H., Lee, B.-J., Schlaepfer, D. D. y Lee, J. W. (2012) «Tetraspan TM4SF5-dependent direct activation of FAK and metastatic potential of hepatocarcinoma cells.» *Journal of cell science*, 125(Pt 24) pp. 5960-73.
- Kajita, M., McClinic, K. N. y Wade, P. a (2004) «Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress.» *Molecular and cellular biology*, 24(17) pp. 7559-7566.
- Kalluri, R. y Weinberg, R. A. (2009) «The basics of epithelial-mesenchymal transition». *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 119(6) pp. 1420-1428.
- Kalluri, R. y Zeisberg, M. (2006) «Fibroblasts in cancer». *Nature reviews. Cancer*, 6(5) pp. 392-401.
- Kamei, M., Saunders, W. B., Bayless, K. J., Dye, L., Davis, G. E. y Weinstein, B. M. (2006) «Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles in vivo.» *Nature*, 442(7101) pp. 453-456.
- Karapetis, C. S., Khambata-Ford, S., Jonker, D. J., O'Callaghan, C. J., Tu, D., Tebbutt, N. C., Simes, R. J., Chalchal, H., Shapiro, J. D., Robitaille, S., Price, T. J., Shepherd, L., Au, H.-J., Langer, C., Moore, M. J. y Zalcborg, J. R. (2008) «K-ras Mutations and Benefit from Cetuximab in Advanced Colorectal Cancer». *New England Journal of Medicine*, 359(17) pp. 1757-1765.
- Kaupila, S., Stenbäck, F., Risteli, J., Jukkola, A. y Risteli, L. (1998) «Aberrant type I and type III collagen gene expression in human breast cancer in vivo.» *The Journal of pathology*, 186(3) pp. 262-268.
- Keely, P. J. (2011) «Mechanisms by which the extracellular matrix and integrin signaling act to regulate the switch between tumor suppression and tumor promotion.» *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 16(3) pp. 205-219.
- Kim, G. P., Colangelo, L. H., Wieand, H. S., Paik, S., Kirsch, I. R., Wolmark, N. y Allegra, C. J. (2007)

- «Prognostic and predictive roles of high-degree microsatellite instability in colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Collaborative Study.» *Journal of clinical oncology*, 25(7) pp. 767-772.
- Kim, K., Lu, Z. y Hay, E. D. (2002) «Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT.» *Cell biology international*, 26(5) pp. 463-476.
- Kim, S., Bakre, M., Yin, H. y Varner, J. A. (2002) «Inhibition of endothelial cell survival and angiogenesis by protein kinase A». *Journal of Clinical Investigation*, 110(7) pp. 933-941.
- Kinugasa, Y., Matsui, T. y Takakura, N. (2014) «CD44 expressed on cancer-associated fibroblasts is a functional molecule supporting the stemness and drug resistance of malignant cancer cells in the tumor microenvironment». *Stem Cells*, 32(1) pp. 145-156.
- Knab, L. M., Ebine, K., Chow, C. R., Raza, S. S., Sahai, V., Patel, A. P., Kumar, K., Bentrem, D. J., Grippo, P. J. y Munshi, H. G. (2014) «Snail cooperates with Kras G12D in vivo to increase stem cell factor and enhance mast cell infiltration.» *Molecular cancer research*, 12(10) pp. 1440-8.
- Kodama, M., Kitadai, Y., Sumida, T., Ohnishi, M., Ohara, E., Tanaka, M., Shinagawa, K., Tanaka, S., Yasui, W. y Chayama, K. (2010) «Expression of platelet-derived growth factor (PDGF)-B and PDGF-receptor β is associated with lymphatic metastasis in human gastric carcinoma.» *Cancer science*, 101(9) pp. 1984-1989.
- Korinek, V., Barker, N., Morin, P. J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. y Clevers, H. (1997) «Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma.» *Science*, 275(5307) pp. 1784-1787.
- Kroepil, F., Fluegen, G., Totikov, Z., Baldus, S. E., Vay, C., Schauer, M., Topp, S. A., Esch, J. S. am, Knoefel, W. T. y Stoecklein, N. H. (2012) «Down-Regulation of CDH1 Is Associated with Expression of SNAI1 in Colorectal Adenomas». *PLoS ONE*, 7(9).
- Kudo-Saito, C., Shirako, H., Takeuchi, T. y Kawakami, Y. (2009) «Cancer Metastasis Is Accelerated through Immunosuppression during Snail-Induced EMT of Cancer Cells». *Cancer Cell*, 15(3) pp. 195-206.
- Kuphal, S., Palm, H. G., Poser, I. y Bosserhoff, A. K. (2005) «Snail-regulated genes in malignant melanoma.» *Melanoma research*, 15(4) pp. 305-313.
- Le, Q.-T., Harris, J., Magliocco, A. M., Kong, C. S., Diaz, R., Shin, B., Cao, H., Trotti, A., Erler, J. T., Chung, C. H., Dicker, A., Pajak, T. F., Giaccia, A. J. y Ang, K. K. (2009) «Validation of lysyl oxidase as a prognostic marker for metastasis and survival in head and neck squamous cell carcinoma: Radiation Therapy Oncology Group trial 90-03.» *Journal of clinical oncology*, 27(26) pp. 4281-4286.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W. y Vogelstein, B. (1997) «Genetic instability in colorectal cancers.» *Nature*

pp. 623-627.

- Lengauer, C., Kinzler, K. W. y Vogelstein, B. (1998) «Genetic instabilities in human cancers.» *Nature*, 396(6712) pp. 643-649.
- Levéen, P., Pekny, M., Gebre-Medhin, S., Swolin, B., Larsson, E. y Betsholtz, C. (1994) «Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities.» *Genes & development*, 8(16) pp. 1875-1887.
- Levental, K. R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J. N., Egeblad, M., Erler, J. T., Fong, S. F. T., Csiszar, K., Giaccia, A., Weninger, W., Yamauchi, M., Gasser, D. L. y Weaver, V. M. (2009) «Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling». *Cell*, 139(5) pp. 891-906.
- Li, L., Asteriou, T., Bernert, B., Heldin, C.-H. y Heldin, P. (2007) «Growth factor regulation of hyaluronan synthesis and degradation in human dermal fibroblasts: importance of hyaluronan for the mitogenic response of PDGF-BB.» *The Biochemical journal*, 404(2) pp. 327-336.
- Li, S., Lu, J., Chen, Y., Xiong, N., Li, L., Zhang, J., Yang, H., Wu, C., Zeng, H. y Liu, Y. (2016) «MCP-1-induced ERK/GSK-3 β /Snail signaling facilitates the epithelial-mesenchymal transition and promotes the migration of MCF-7 human breast carcinoma cells.» *Cellular & molecular immunology*. Chinese Society of Immunology and The University of Science and Technology, marzo.
- Li, X.-Y., Zhou, X., Rowe, R. G., Hu, Y., Schlaepfer, D. D., Ilić, D., Dressler, G., Park, A., Guan, J.-L. y Weiss, S. J. (2011) «Snai1 controls epithelial-mesenchymal lineage commitment in focal adhesion kinase-null embryonic cells.» *The Journal of cell biology*, 195(5) pp. 729-738.
- Liang, P. S., Chen, T.-Y. y Giovannucci, E. (2009) «Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis.» *International journal of cancer*, 124(10) pp. 2406-2415.
- Liebner, S., Cattelino, A., Gallini, R., Rudini, N., Iurlaro, M., Piccolo, S. y Dejana, E. (2004) «Beta-catenin is required for endothelial-mesenchymal transformation during heart cushion development in the mouse.» *The Journal of cell biology*, 166(3) pp. 359-367.
- Lindahl, P., Johansson, B. R., Levéen, P. y Betsholtz, C. (1997) «Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice.» *Science*, 277(5323) pp. 242-245.
- Lindblom, a (2001) «Different mechanisms in the tumorigenesis of proximal and distal colon cancers.» *Current opinion in oncology*, 13(1) pp. 63-69.
- Liu, Z.-C., Wang, H.-S., Zhang, G., Liu, H., Chen, X.-H., Zhang, F., Chen, D.-Y., Cai, S.-H. y Du, J. (2014) «AKT/GSK-3 β regulates stability and transcription of snail which is crucial for bFGF-induced epithelial-mesenchymal transition of prostate cancer cells.» *Biochimica et biophysica acta*, 1840(10) pp. 3096-3105.

- Lomelí, H., Starling, C. y Gridley, T. (2009) «Epiblast-specific Snai1 deletion results in embryonic lethality due to multiple vascular defects.» *BMC research notes*, 2 p. 22.
- Lu, C., Sun, X., Sun, L., Sun, J., Lu, Y., Yu, X., Zhou, L. y Gao, X. (2013) «Snail mediates PDGF-BB-induced invasion of rat bone marrow mesenchymal stem cells in 3D collagen and chick chorioallantoic membrane». *Journal of cellular physiology*, 228(9) pp. 1827-1833.
- Lu, P., Weaver, V. M. y Werb, Z. (2012) «The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression». *Journal of Cell Biology*, 196(4) pp. 395-406.
- Lynch, H. T., Lynch, J. F., Lynch, P. M. y Attard, T. (2008) «Hereditary colorectal cancer syndromes: Molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management». *En Familial Cancer*, pp. 27-39.
- Lyons, J. G., Patel, V., Roue, N. C., Fok, S. Y., Soon, L. L., Halliday, G. M. y Gutkind, J. S. (2008) «Snail up-regulates proinflammatory mediators and inhibits differentiation in oral keratinocytes». *Cancer Research*, 68(12) pp. 4525-4530.
- Ma, Y., Yang, Y., Wang, F., Zhang, P., Shi, C., Zou, Y. y Qin, H. (2013) «Obesity and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies.» *PLoS ONE*, 8(1) p. e53916.
- Mandel, J. S., Church, T. R., Bond, J. H., Ederer, F., Geisser, M. S., Mongin, S. J., Snover, D. C. y Schuman, L. M. (2000) «The effect of fecal occult-blood screening on the incidence of colorectal cancer.» *The New England Journal of Medicine*, 343(22) pp. 1603-1607.
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., Campbell, L. L., Polyak, K., Briskin, C., Yang, J. y Weinberg, R. A. (2008) «The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells». *Cell*, 133(4) pp. 704-715.
- Markowitz, S. y Bertagnolli, M. (2009) «Molecular basis of colorectal cancer». *New England Journal of ...* pp. 2449-2460.
- Markowitz, S. D. y Bertagnolli, M. M. (2009) «Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer.» *The New England journal of medicine*, 361(25) pp. 2449-2460.
- Martin, T. A., Goyal, A., Watkins, G. y Jiang, W. G. (2005) «Expression of the Transcription Factors Snail, Slug, and Twist and Their Clinical Significance in Human Breast Cancer». *Annals of Surgical Oncology*, 12(6) pp. 488-496.
- Martinez-Outschoorn, U. E., Lisanti, M. P. y Sotgia, F. (2014) «Catabolic cancer-associated fibroblasts transfer energy and biomass to anabolic cancer cells, fueling tumor growth». *Seminars in cancer biology*, 25, abril, pp. 47-60.
- Massagué, J. (2008) «TGFbeta in Cancer.» *Cell*, 134(2) pp. 215-230.
- Matkowskyj, K. A., Keller, K., Glover, S., Kornberg, L., Tran-Son-Tay, R. y Benya, R. V. (2003) «Expression of GRP and its receptor in well-differentiated colon cancer cells correlates with

- the presence of focal adhesion kinase phosphorylated at tyrosines 397 and 407.» *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 51(8) pp. 1041-1048.
- Morikawa, S., Baluk, P., Kaidoh, T., Haskell, A., Jain, R. K. y McDonald, D. M. (2002) «Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors.» *The American journal of pathology*, 160(3) pp. 985-1000.
- Morin, P. J., Sparks, A. B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B. y Kinzler, K. W. (1997) «Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC.» *Science*, 275(5307) pp. 1787-1790.
- Morson, B. (1974) «President's address. The polyp-cancer sequence in the large bowel.» *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 67 pp. 451-457.
- Mouw, J. K., Ou, G. y Weaver, V. M. (2014) «Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction.» *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(12) pp. 771-785.
- Murray, S. a, Oram, K. F. y Gridley, T. (2007) «Multiple functions of Snail family genes during palate development in mice.» *Development*, 134(9) pp. 1789-1797.
- Neve, A., Cantatore, F. P., Maruotti, N., Corrado, A. y Ribatti, D. (2014) «Extracellular matrix modulates angiogenesis in physiological and pathological conditions». *BioMed Research International*, 2014, enero, p. 756078.
- Newman, A. C., Nakatsu, M. N., Chou, W., Gershon, P. D. y Hughes, C. C. W. (2011) «The requirement for fibroblasts in angiogenesis: fibroblast-derived matrix proteins are essential for endothelial cell lumen formation.» *Molecular biology of the cell*, 22(20) pp. 3791-3800.
- Nicosia, R. F., Bonanno, E. y Smith, M. (1993) «Fibronectin promotes the elongation of microvessels during angiogenesis in vitro.» *Journal of cellular physiology*, 154(3) pp. 654-661.
- Norton, S. A. y Thomas, M. G. (1999) «Staging of rectosigmoid neoplasia with colonoscopic endoluminal ultrasonography». *British Journal of Surgery*, 86(7) pp. 942-946.
- Nosho, K., Irahara, N., Shima, K., Kure, S., Kirkner, G. J., Schernhammer, E. S., Hazra, A., Hunter, D. J., Quackenbush, J., Spiegelman, D., Giovannucci, E. L., Fuchs, C. S. y Ogino, S. (2008) «Comprehensive biostatistical analysis of CpG island methylator phenotype in colorectal cancer using a large population-based sample». *PLoS ONE*, 3(11) p. e3698.
- Orimo, A., Gupta, P. B., Sgroi, D. C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V. J., Richardson, A. L. y Weinberg, R. A. (2005) «Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion». *Cell*, 121(3) pp. 335-348.
- Orimo, A. y Weinberg, R. A. (2006) «Stromal fibroblasts in cancer: A novel tumor-promoting cell type». *Cell Cycle* pp. 1597-1601.
- Ostman, A. y Augsten, M. (2009) «Cancer-associated fibroblasts and tumor growth--bystanders

- turning into key players.» *Current opinion in genetics & development*, 19(1) pp. 67-73.
- Paget, S. (1889) «THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST.» *The Lancet*. Elsevier, 133(3421) pp. 571-573.
- Pálmer, H. G., Larriba, M. J., García, J. M., Ordóñez-Morán, P., Peña, C., Peiró, S., Puig, I., Rodríguez, R., de la Fuente, R., Bernad, A., Pollán, M., Bonilla, F., Gamallo, C., de Herreros, A. G. y Muñoz, A. (2004) «The transcription factor SNAIL represses vitamin D receptor expression and responsiveness in human colon cancer.» *Nature medicine*, 10(9) pp. 917-919.
- Park, J. A., Kim, D. Y., Kim, Y.-M., Lee, I.-K. y Kwon, Y.-G. (2015) «Endothelial Snail Regulates Capillary Branching Morphogenesis via Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 Expression.» *PLoS genetics*, 11(7) p. e1005324.
- Parsons, D. W., Wang, T.-L., Samuels, Y., Bardelli, A., Cummins, J. M., DeLong, L., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Willson, J. K. V, Markowitz, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Lengauer, C. y Velculescu, V. E. (2005) «Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway.» *Nature*, 436(7052) p. 792.
- Paulsson, J., Ehnman, M. y Östman, A. (2014) «PDGF receptors in tumor biology: prognostic and predictive potential.» *Future Oncol.*, 10(9) pp. 1695-708.
- Peinado, H., Olmeda, D. y Cano, A. (2007) «Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?» *Nature Reviews Cancer*, 7(6) pp. 415-428.
- Peinado, H., Quintanilla, M. y Cano, A. (2003) «Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions.» *The Journal of biological chemistry*, 278(23) pp. 21113-23.
- Pena, C., Cespedes, M. V., Lindh, M. B., Kiflemariam, S., Mezheyeuski, A., Edqvist, P. H., Hagglof, C., Birgisson, H., Bojmar, L., Jirstrom, K., Sandstrom, P., Olsson, E., Veerla, S., Gallardo, A., Sjoblom, T., Chang, A. C. M., Reddel, R. R., Manges, R., Augsten, M. y Ostman, A. (2013) «STC1 expression by cancer-associated fibroblasts drives metastasis of colorectal cancer». *Cancer Research*, 73(4) pp. 1287-1297.
- Peña, C., Garcia, J. M., Larriba, M. J., Barderas, R., Gomez, I., Herrera, M., Garcia, V., Silva, J., Dominguez, G., Rodriguez, R., Cuevas, J., de Herreros, A. G., Casal, J. I., Munoz, A. y Bonilla, F. (2009) «SNAIL expression in colon cancer related with CDH1 and VDR downregulation in normal adjacent tissue». *Oncogene*, 28(49) pp. 4375-4385.
- Peña, C., García, J. M., Silva, J., García, V., Rodríguez, R., Alonso, I., Millán, I., Salas, C., de Herreros, A. G., Muñoz, A. y Bonilla, F. (2005) «E-cadherin and vitamin D receptor regulation by SNAIL and ZEB1 in colon cancer: clinicopathological correlations». *Human Molecular Genetics* , 14 (22) pp. 3361-3370.
- Pickhardt, P. J., Choi, J. R., Hwang, I., Butler, J. A., Puckett, M. L., Hildebrandt, H. A., Wong, R. K.,

- Nugent, P. A., Mysliwiec, P. A. y Schindler, W. R. (2003) «Computed tomographic virtual colonoscopy to screen for colorectal neoplasia in asymptomatic adults.» *New England Journal of Medicine*, 349(23) pp. 2191-2200.
- Pierschbacher, M. D. y Ruoslahti, E. (1984) «Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule». *Nature*, 309(5963) pp. 30-33.
- Pietras, K., Sjöblom, T., Rubin, K., Heldin, C.-H. y Östman, A. (2003) «PDGF receptors as cancer drug targets». *Cancer Cell*, 3(5) pp. 439-443.
- Provenzano, P. P., Eliceiri, K. W., Campbell, J. M., Inman, D. R., White, J. G. y Keely, P. J. (2006) «Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion.» *BMC medicine*, 4(1) p. 38.
- Rajagopalan, H., Bardelli, A., Lengauer, C., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. y Velculescu, V. E. (2002) «Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status». *Nature*, 418(6901) p. 934.
- Rajaram, M., Li, J., Egeblad, M. y Powers, R. S. (2013) «System-wide analysis reveals a complex network of tumor-fibroblast interactions involved in tumorigenicity.» *PLoS genetics*, 9(9) p. e1003789.
- Rajkumar, V. S., Shiwen, X., Bostrom, M., Leoni, P., Muddle, J., Ivarsson, M., Gerdin, B., Denton, C. P., Bou-Gharios, G., Black, C. M. y Abraham, D. J. (2006) «Platelet-derived growth factor-beta receptor activation is essential for fibroblast and pericyte recruitment during cutaneous wound healing.» *The American journal of pathology*, 169(6) pp. 2254-2265.
- Räsänen, K. y Vaheri, A. (2010) «Activation of fibroblasts in cancer stroma». *Experimental cell research*, 316(17) pp. 2713-2722.
- Rembacken, B. J., Fujii, T., Cairns, a, Dixon, M. F., Yoshida, S., Chalmers, D. M. y Axon, a T. (2000) «Flat and depressed colonic neoplasms: a prospective study of 1000 colonoscopies in the UK.» *Lancet*, 355(9211) pp. 1211-1214.
- Rex, D. K. (2002) «Barium studies/virtual colonoscopy: The gastroenterologist's perspective». *Gastrointestinal Endoscopy*, 55(7) pp. S33-S36.
- Ribic, C. M., Sargent, D. J., Moore, M. J., Thibodeau, S. N., French, A. J., Goldberg, R. M., Hamilton, S. R., Laurent-Puig, P., Gryfe, R., Shepherd, L. E., Tu, D., Redston, M. y Gallinger, S. (2003) «Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer.» *The New England journal of medicine*, 349(3) pp. 247-257.
- Rowe, R. G., Li, X. Y., Hu, Y., Saunders, T. L., Virtanen, I., De Herreros, A. G., Becker, K. F., Ingvarsen, S., Engelholm, L. H., Bommer, G. T., Fearon, E. R. y Weiss, S. J. (2009) «Mesenchymal cells reactivate Snai1 expression to drive three-dimensional invasion programs». *Journal of Cell*

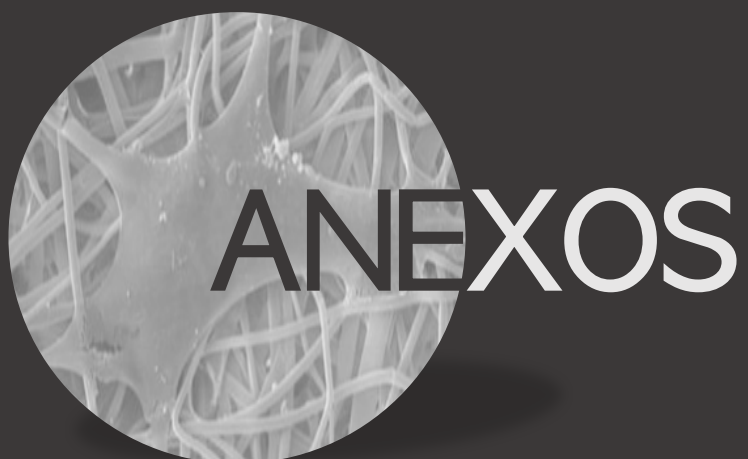
Biology, 184(3) pp. 399-408.

- Ruoslahti, E. (2002) «Specialization of tumour vasculature.» *Nature reviews. Cancer*, 2(2) pp. 83-90.
- Samowitz, W. S., Curtin, K., Ma, K. N., Schaffer, D., Coleman, L. W., Leppert, M. y Slattery, M. L. (2001) «Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level». *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10(9) pp. 917-923.
- Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Yan, H., Gazdar, A., Powell, S. M., Riggins, G. J., Willson, J. K. V, Markowitz, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. y Velculescu, V. E. (2004) «High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers.» *Science*, 304(5670) p. 554.
- Scheel, C., Onder, T., Karnoub, A., Weinberg, R. A. y Talmadge, J. E. (2007) «Adaptation versus selection: The origins of metastatic behavior». *Cancer Research*, 67(24) pp. 11476-11480.
- Shaw, R. J. y Cantley, L. C. (2006) «Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth.» *Nature*, 441(7092) pp. 424-430.
- Shibuya, M. (2008) «Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis.» *BMB reports*, 41(4) pp. 278-286.
- Shields, M. A., Dangi-Garimella, S., Krantz, S. B., Bentrem, D. J. y Munshi, H. G. (2011) «Pancreatic cancer cells respond to type I collagen by inducing snail expression to promote membrane type 1 matrix metalloproteinase-dependent collagen invasion». *Journal of Biological Chemistry*, 286(12) pp. 10495-10504.
- Shields, M. A., Krantz, S. B., Bentrem, D. J., Dangi-Garimella, S. y Munshi, H. G. (2012) «Interplay between β 1-integrin and Rho signaling regulates differential scattering and motility of pancreatic cancer cells by snail and Slug proteins.» *The Journal of biological chemistry*, 287(9) pp. 6218-6229.
- Sonnenberg, A. y Genta, R. M. (2012) «Helicobacter pylori is a Risk Factor for Colonic Neoplasms». *The American Journal of Gastroenterology*, 108(2) pp. 208-215.
- Sottile, J. (2002) «Fibronectin Polymerization Regulates the Composition and Stability of Extracellular Matrix Fibrils and Cell-Matrix Adhesions». *Molecular Biology of the Cell*, 13(10) pp. 3546-3559.
- Sottile, J., Hocking, D. C. y Swiatek, P. J. (1998) «Fibronectin matrix assembly enhances adhesion-dependent cell growth». *Journal of cell science*, 111(19) pp. 2933-2943.
- Stanisavljevic, J., Loubat-Casanovas, J., Herrera, M., Luque, T., Peña, R., Lluch, A., Albanell, J., Bonilla, F., Rovira, A., Peña, C., Navajas, D., Rojo, F., García de Herreros, A. y Baulida, J. (2015) «Snai1-expressing fibroblasts in the tumor microenvironment display mechanical properties that support metastasis.» *Cancer research*, 75(2) pp. 284-295.
- Stanisavljevic, J., Porta-de-la-Riva, M., Batlle, R., de Herreros, a. G. y Baulida, J. (2011) «The p65

- subunit of NF- κ B and PARP1 assist Snai1 in activating fibronectin transcription». *Journal of Cell Science*, 124(24) pp. 4161-4171.
- Stewart, B. W. y Wild, C. P. (2014) *World Cancer Report 2014*. World Health Organization: Geneva.
- Strippoli, R., Loureiro, J., Moreno, V., Benedicto, I., Pérez Lozano, M. L., Barreiro, O., Pellinen, T., Minguet, S., Foronda, M., Osteso, M. T., Calvo, E., Vázquez, J., López Cabrera, M. y del Pozo, M. A. (2015) «Caveolin-1 deficiency induces a MEK-ERK1/2-Snail-1-dependent epithelial-mesenchymal transition and fibrosis during peritoneal dialysis.» *EMBO molecular medicine*, 7(1) pp. 102-123.
- Sugimoto, H., Mundel, T. M., Kieran, M. W. y Kalluri, R. (2006) «Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment». *Cancer Biology and Therapy*, 5(12) pp. 1640-1646.
- Suzuki, S., Dobashi, Y., Hatakeyama, Y., Tajiri, R., Fujimura, T., Heldin, C. H. y Ooi, A. (2010) «Clinicopathological significance of platelet-derived growth factor (PDGF)-B and vascular endothelial growth factor-A expression, PDGF receptor- β phosphorylation, and microvessel density in gastric cancer.» *BMC cancer*, 10(1) p. 659.
- Sweet, D. T., Chen, Z., Wiley, D. M., Bautch, V. L. y Tzima, E. (2012) «The adaptor protein Shc integrates growth factor and ECM signaling during postnatal angiogenesis.» *Blood*, 119(8) pp. 1946-1955.
- Taylor, D. P., Burt, R. W., Williams, M. S., Haug, P. J. y Cannon-Albright, L. A. (2010) «Population-Based Family History-Specific Risks for Colorectal Cancer: A Constellation Approach». *Gastroenterology*, 138(3) pp. 877-885.
- Thiery, J. P., Acloque, H. H., Huang, R. Y. J. y Nieto, M. A. (2009) «Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease.» *Cell*, 139(5) pp. 871-890.
- Troisi, R. J., Freedman, A. N. y Devesa, S. S. (1999) «Incidence of colorectal carcinoma in the U.S.: An update of trends by gender, race, age, subsite, and stage, 1975-1994». *Cancer*, 85(8) pp. 1670-1676.
- Valdes, F., Alvarez, A. M., Locascio, A., Vega, S., Herrera, B., Fernandez, M., Benito, M., Nieto, M. A. y Fabregat, I. (2002) «The Epithelial Mesenchymal Transition Confers Resistance to the Apoptotic Effects of Transforming Growth Factor beta in Fetal Rat Hepatocytes». *Mol. Cancer Res.*, 1(1) pp. 68-78.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. y Speleman, F. (2002) «Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.» *Genome biology*, 3(7) p. RESEARCH0034.
- Vandewalle, C., Comijn, J., De Craene, B., Vermassen, P., Bruyneel, E., Andersen, H., Tulchinsky, E., Van Roy, F. y Berx, G. (2005) «SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different

- epithelial cell-cell junctions.» *Nucleic Acids Research*, 33(20) pp. 6566-6578.
- Vazquez, A., Bond, E. E., Levine, A. J. y Bond, G. L. (2008) «The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy». *Nat Rev Drug Discov*, 7(12) pp. 979-987.
- Vega, S., Morales, A. V, Ocaña, O. H., Valdés, F., Fabregat, I. y Nieto, M. A. (2004) «Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death.» *Genes & development*, 18(10) pp. 1131-1143.
- Vogelstein, B. y Kinzler, K. W. (2002) «Colorectal tumors». En Vogelstein, B. y Kinzler, K. W. (eds.) *The genetic basis of human cancer*. McGraw-Hil, New York, pp. 583-612.
- Wang, H., Zhang, G., Zhang, H., Zhang, F., Zhou, B., Ning, F., Wang, H. S., Cai, S. H. y Du, J. (2014) «Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype and cancer stem cell-like properties in cisplatin-resistant lung cancer cells through AKT/ β -catenin/Snail signaling pathway». *European Journal of Pharmacology*, 723(1) pp. 156-166.
- Wang, Y., Shi, J., Chai, K., Ying, X. y Zhou, B. P. (2013) «The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis.» *Current cancer drug targets*, 13(9) pp. 963-972.
- Watanabe, T., Wu, T. T., Catalano, P. J., Ueki, T., Satriano, R., Haller, D. G., Benson, A. B. y Hamilton, S. R. (2001) «Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer.» *The New England journal of medicine*, 344(16) pp. 1196-1206.
- Whelan, M. C. y Senger, D. R. (2003) «Collagen I initiates endothelial cell morphogenesis by inducing actin polymerization through suppression of cyclic AMP and protein kinase A». *Journal of Biological Chemistry*, 278(1) pp. 327-334.
- Worthley, D. L., Giraud, A. S. y Wang, T. C. (2010) «Stromal fibroblasts in digestive cancer.» *En Cancer Microenvironment*, pp. 117-125.
- Wu, Y., Deng, J., Rychahou, P. G., Qiu, S., Evers, B. M. y Zhou, B. P. (2009) «Stabilization of snail by NF-kappaB is required for inflammation-induced cell migration and invasion.» *Cancer cell*, 15(5) pp. 416-428.
- Xie, B., Lin, W., Ye, J., Wang, X., Zhang, B., Xiong, S., Li, H. y Tan, G. (2015) «DDR2 facilitates hepatocellular carcinoma invasion and metastasis via activating ERK signaling and stabilizing SNAIL1.» *Journal of experimental & clinical cancer research*. BioMed Central, 34(1) p. 101.
- Xouri, G. y Christian, S. (2010) «Origin and function of tumor stroma fibroblasts». *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 21(1) pp. 40-46.
- Yonenaga, Y., Mori, A., Onodera, H., Yasuda, S., Oe, H., Fujimoto, A., Tachibana, T. y Imamura, M. (2005) «Absence of smooth muscle actin-positive pericyte coverage of tumor vessels correlates with hematogenous metastasis and prognosis of colorectal cancer patients». *Oncology*, 69(2) pp. 159-166.
- Young, E. W. K., Wheeler, A. R. y Simmons, C. a (2007) «Matrix-dependent adhesion of vascular and

- valvular endothelial cells in microfluidic channels.» *Lab on a chip*, 7(12) pp. 1759-1766.
- Zhang, K., Corsa, C. A., Ponik, S. M., Prior, J. L., Piwnica-Worms, D., Eliceiri, K. W., Keely, P. J. y Longmore, G. D. (2013) «The collagen receptor discoidin domain receptor 2 stabilizes SNAIL1 to facilitate breast cancer metastasis.» *Nature cell biology*, 15(6) pp. 677-687.
- Zhu, G. G., Risteli, L., Mäkinen, M., Risteli, J., Kauppila, a y Stenbäck, F. (1995) «Immunohistochemical study of type I collagen and type I pN-collagen in benign and malignant ovarian neoplasms.» *Cancer*, 75(4) pp. 1010-1017.



ANEXOS

El trabajo desarrollado en este período de investigación ha generado una serie de resultados que han sido recogidos en varias publicaciones incluidas a continuación:

Protumorigenic effects of Snail-expression fibroblasts on colon cancer cells

Alberto Herrera¹, Mercedes Herrera¹, Lorena Alba-Castellón², Javier Silva¹, Vanesa García¹, Jordina Loubat-Casanovas², Ana Álvarez-Cienfuegos³, José Miguel García¹, Rufo Rodríguez⁴, Beatriz Gil¹, M^a Jesús Citores⁵, M^a Jesús Larriba⁶, J. Ignacio Casal⁷, Antonio García de Herreros^{2,8}, Félix Bonilla¹ and Cristina Peña¹

¹ Department of Medical Oncology, Hospital Universitario Puerta de Hierro de Majadahonda, Majadahonda, Madrid, Spain

² Programa de Recerca en Càncer, Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques, Barcelona, Spain

³ Department of Molecular Immunology, Hospital Universitario Puerta de Hierro de Majadahonda, Majadahonda, Madrid, Spain

⁴ Department of Pathology, Hospital Virgen de la Salud, Toledo, Spain

⁵ Department of Tumour Immunology, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Madrid, Spain

⁶ Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Consejo Superior de Investigaciones Científicas - Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

⁷ Functional Proteomics Laboratory, Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Madrid, Spain

⁸ Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

Snail1 is a transcriptional factor that plays an important role in epithelial–mesenchymal transition and in the acquisition of invasive properties by epithelial cells. In colon tumors, Snail1 expression in the stroma correlates with lower specific survival of cancer patients. However, the role(s) of Snail1 expression in stroma and its association with patients' survival have not been determined. We used human primary carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) or normal fibroblasts (NFs) and fibroblast cell lines to analyze the effects of Snail1 expression on the protumorigenic capabilities in colon cancer cells. Snail1 expression was higher in CAFs than in NFs and, as well as α -SMA, a classic marker of activated CAFs. Moreover, in tumor samples from 50 colon cancer patients, *SNAI1* expression was associated with expression of other CAF markers, such as α -SMA and fibroblast activation protein. Interestingly, coculture of CAFs with colon cells induced a significant increase in epithelial cell migration and proliferation, which was associated with endogenous *SNAI1* expression levels. Ectopic manipulation of Snail1 in fibroblasts demonstrated that Snail1 expression controlled migration as well as proliferation of cocultured colon cancer cells in a paracrine manner. Furthermore, expression of Snail1 in fibroblasts was required for the coadjuvant effect of these cells on colon cancer cell growth and invasion when coxenografted in nude mice. Finally, cytokine profile changes, particularly MCP-3 expression, in fibroblasts are put forward as mediators of Snail1-derived effects on colon tumor cell migration. In summary, these studies demonstrate that Snail1 is necessary for the protumorigenic effects of fibroblasts on colon cancer cells.

Key words: Snail1, cancer-associated fibroblasts, colon cancer, cell migration, cell proliferation

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Conflicts of interest: Nothing to report

Grant sponsor: Fundación Científica AECC; **Grant numbers:** SAF2010-20750, S2010/BMD-2344, RTICC-RD12/0036/0041, PI12/02037; **Grant sponsor:** Fundación Banco Santander, Instituto de Salud Carlos III, AECC

DOI: 10.1002/ijc.28613

History: Received 27 May 2013; Accepted 4 Nov 2013; Online 16 Nov 2013

Correspondence to: Cristina Peña, Department of Medical Oncology, Hospital Universitario Puerta de Hierro de Majadahonda, Majadahonda, Madrid, Spain, Tel.: +34-91-1916770, E-mail: cpena@idiphim.org or Félix Bonilla, Department of Medical Oncology, Hospital Universitario Puerta de Hierro de Majadahonda, Majadahonda, Madrid, Spain, E-mail: felix.bonilla@salud.madrid.org

Snail1 transcriptional factor is a key factor for triggering epithelial–mesenchymal transition (EMT), a process characterized by the loss of epithelial characteristics and the acquisition of mesenchymal traits and higher motility.¹

Snail1 expression is observed at different stages during embryo development and is required for numerous developmental processes.² Snail1 expression and EMT features have also been observed in breast, prostate, lung, ovarian, melanoma, colon and esophageal cancers.^{3–13} In most cases, Snail1 is detected in the invasive areas of the tumor. An analysis of colon tumors has shown that Snail1 is mainly detected in the tumor stroma, in cells with a fibroblast phenotype. Furthermore, Snail1 expression in tumor stroma is associated with shorter specific survival in colon cancer patients.¹² In addition, we recently noted the paracrine effects of Snail1 expression in human colon cells, showing downregulation of *CDH1* and *VDR* gene expression when cocultured with Snail1-overexpressing colon cancer cells.¹⁴ However, the molecular mechanism underlying this association is not yet clear.

What's new?

When colon tumors express the transcription factor Snail1, it's bad news for the patient: chances of survival are lower. But how does this protein spur cancer? In this paper, the authors examined the effects of Snail1 in fibroblasts cultured together with colon cells. By manipulating Snail1 levels in the fibroblasts, they showed that the protein controls migration and proliferation of the nearby colon cells. In mice, Snail1 was required for colon cancer cell growth and invasion.

Taking all these data together, our study aimed to characterize Snail1 as a novel enhancer of paracrine-derived effects on colon cancer cell migration and proliferation and to describe the novel cytokine profile induced by Snail1 expression in fibroblasts.

Material and Methods**Establishment of primary colon NFs and colon cancer CAFs**

For CAF and NF establishment, fresh tumor and normal colon mucosa samples were obtained from Puerta de Hierro University Hospital, Majadahonda, and Virgen de la Salud Hospital, Toledo, between January and December 2011. Informed written consent was obtained from all participants after an explanation of the nature of the study, as approved by the Research Ethics Board of Puerta de Hierro Majadahonda University Hospital. For CAF establishment and growth details, see Supporting Information.

To evaluate the CAF enrichment of the culture, Vimentin and Pan Cytokeratin (PanCK) were analyzed for immunofluorescence (Supporting Information Fig. 1A).

Normal and colon tumor human samples

The study is based on two consecutive series of 50 and 65 patients who had surgery for colon cancer between January 1998 and January 2003. The first patient cohort was a subgroup of a cohort previously described by Peña *et al.*,¹⁵ and the second, a subgroup of a cohort previously described by Herrera *et al.*¹⁶ Informed written consent was obtained from all participants, as approved by the Research Ethics Board of Puerta de Hierro Majadahonda University Hospital. Colon cancer-derived samples were obtained immediately after surgery, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until processing.

RNA treatment and quantitative real-time polymerase chain reaction

RNA extraction, target gene mRNA quantification and synthesis of cDNA were performed as described elsewhere.¹⁴

Immunohistochemistry and immunofluorescence analysis in human and mouse samples

The following antibodies were used in our study: SNAI1 mAb EC3 antibody,¹⁷ anti-alpha smooth muscle actin antibody (1A4; Abcam, Cambridge, UK), polyclonal antibody to fibroblast activation protein (FAP) alpha (Imgenex, San Diego, CA), monoclonal antibodies anti-pan cytokeratin (ab6401, Abcam, Cambridge, UK), anti-vimentin (ab92547,

Abcam, Cambridge, UK), anti-Ki67 (ab21700, Abcam, Cambridge, UK) and anti-E-cadherin (610182, BD Transduction Laboratories, San Jose, CA). Procedures were performed as described in Supporting Information.^{12,18}

Coculture of tumor colon cells and human colon primary CAFs or fibroblasts cell lines for migration assays

Colon tumor cell lines were cocultured with colon primary CAFs or fibroblasts cell line for migration assays. Cells were cocultured with physical separation, in a setting in which primary CAFs were seeded in the lower compartment of a transwell system and colon cells in the upper one. After 48 hr, epithelial cells that had reached the lower surface of the filter were measured by fluorescence. For procedure and growth details, see Supporting Information.

Coculture of tumor colon cells and fibroblast cell lines for proliferation assays

Proliferation assays were carried out in 24-well plates by coculturing Snail1-expressing cells in the upper chamber of a 0.4- μm transwell culture (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) and SW480-ADH-GFP cells in the lower one. Cells were grown in dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) containing 5% fetal bovine serum (FBS) for 6 days; proliferation rate was analyzed at 3 and 6 days by a fluorescence reader (Tecan Infinite 200 Pro, Männedorf, Switzerland).

Fluorescence activated cell sorting (FACS) analysis of the cell cycle of colon cancer cells

Tumor colon cells were incubated with conditioned medium from fibroblasts or CAFs for 24 hr. Afterward, cells were fixed in 70% ethanol and treated with 0.2 mg/ml RNase (Qiagen, Hilden, Germany) and propidium iodide (Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO) at 20 $\mu\text{g/ml}$ in phosphate buffered saline (PBS). Cell DNA content was evaluated in a MACS-Quant Analyzer (Miltenyi Biotec Inc, Bergisch Gladbach, Germany). See details in Supporting Information.

In vivo xenograft tumor model

One million HT-29 M6 cells plus 10^5 MEFs were subcutaneously injected into the flank of 8-week-old athymic female nude mice. Growth of the tumor was followed every other day after the first week. The study was approved by the Animal Research Ethical Committee of the PRBB, $N = 6$.

Human protein cytokine array

Conditioned medium was harvested from fibroblasts and incubated with membranes containing an array of 80 human

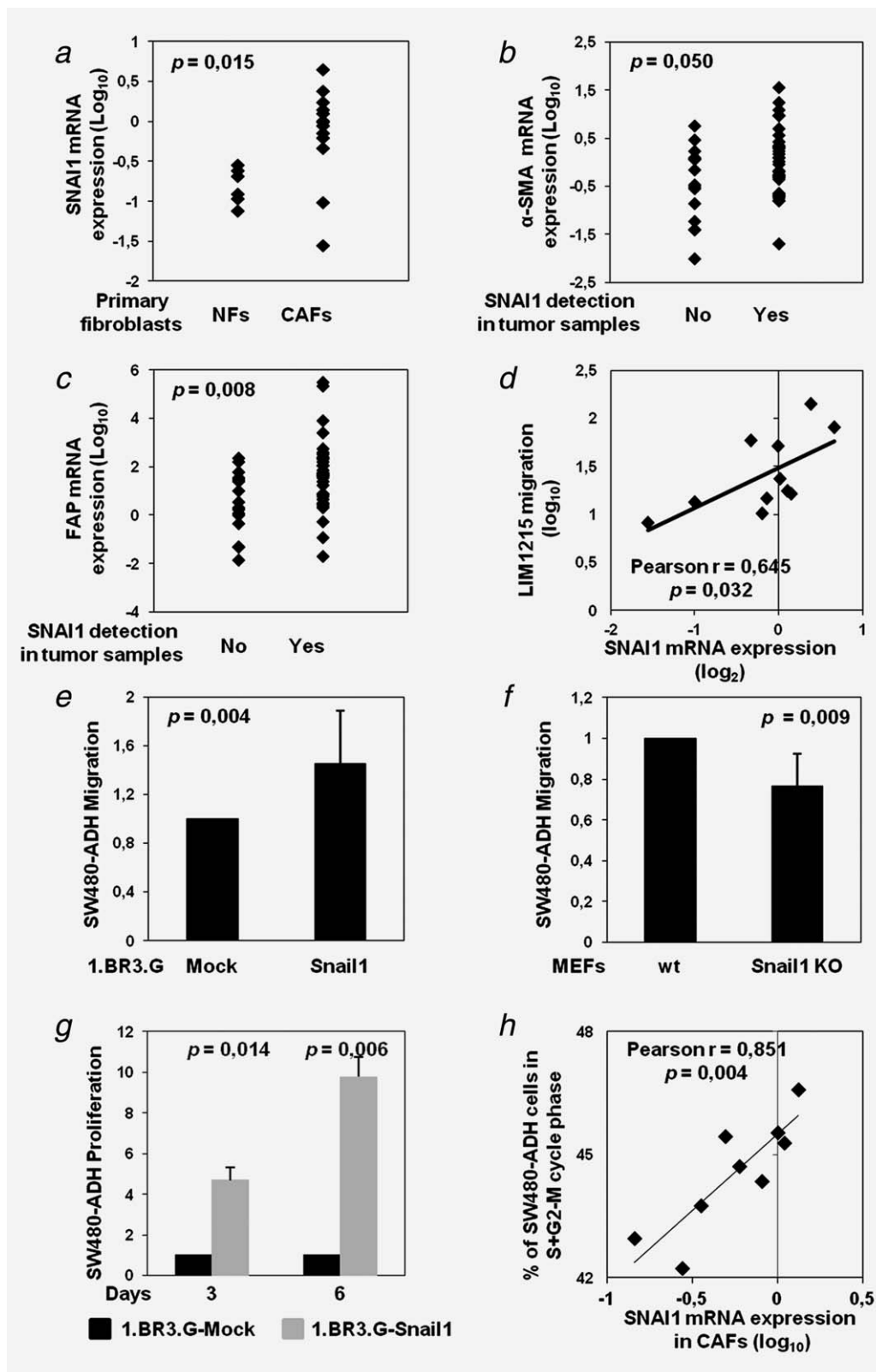


Figure 1. *SNAIL1* expression in human primary CAFs is suggested as an activated fibroblast marker and enhances colon cancer migration and proliferation in a paracrine manner. Increased expression levels of *SNAIL1* (a) in CAFs versus NFs. Association between *SNAIL1* expression and α-SMA (b) or FAP (c) gene expression levels in human tumor samples. Correlation between *SNAIL1* expression levels of CAFs and migration of cocultured LIM1215 colon cancer cells (d). Ectopic expression of Snail1 in fibroblasts enhanced 48 hr migration of SW480-ADH-Mock colon cancer cells (e). SW480-ADH-Mock migration decreased when cocultured with knockout MEFs (f). Proliferation of SW480-ADH-Mock cells is stimulated by Snail-expressing fibroblasts (g). Correlation of *SNAIL1* expression levels in CAFs from nine different patients and the percentage of colon cells in phases S+G2-M after incubation with CAF-conditioned medium (h).

cytokine antibodies (RayBio® Human Cytokine Antibody Array 5; RayBiotech, Norcross, Ga., USA). The bound complex was detected with Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) at 800 nm using Streptavidin DyLight 800 Conjugates (Rockland Immunochemicals Inc., Gilbertsville, PA). Details are described in Supporting Information.

Colon cell migration with recombinant protein

Colon tumor cell migration assays, developed with medium supplemented with the corresponding cytokines, were conducted as described above and in Supporting Information.

Results and Discussion

Snail1 gene (*SNAIL1*) expression was determined in cancer-associated fibroblasts (CAFs), isolated from 13 colon cancer patients, and compared with the expression in fibroblasts isolated from normal colon mucosa of five colon cancer patients (NFs). *SNAIL1* mRNA expression was detected in CAFs from all patients' samples, with relative expression levels between 2.81 and 0.34. Interestingly, expression levels of mRNA *SNAIL1* were higher in CAFs than in fibroblasts from normal

colon mucosa (Fig. 1a). Thus, these data revealing a significant increase of *SNAIL1* expression in CAFs vs. NFs suggest that Snail1 can be considered a CAF marker. As a control, α -smooth-muscle-actin (α -SMA), a well-studied marker of these fibroblasts,¹⁹ was also upregulated in CAF vs. NF (Supporting Information Fig. 1B).

In view of these data, the association between *SNAIL1* expression and CAF markers was studied in normal and tumor samples of 50 colon cancer patients. As shown in Figures 1b and 1c, *SNAIL1* expression was associated with α -SMA and FAP expression markers. Moreover, immunohistochemistry (IHC) analysis of *SNAIL1*, α -SMA and FAP in human colon tumor samples showed staining that overlapped the three markers (Supporting Information Fig. 1C).

To investigate the relevance of Snail1 expression in the properties of CAFs, we performed migration assays in Boyden chambers using colon cancer cells cocultured with primary CAFs isolated from 11 colon cancer patients. As expected, CAFs enhanced LIM1215 cell migration between 8- and 140-fold more than cells cultured without fibroblast stimulation. Interestingly, statistical analysis showed direct correlation between mRNA *SNAIL1* expression levels in

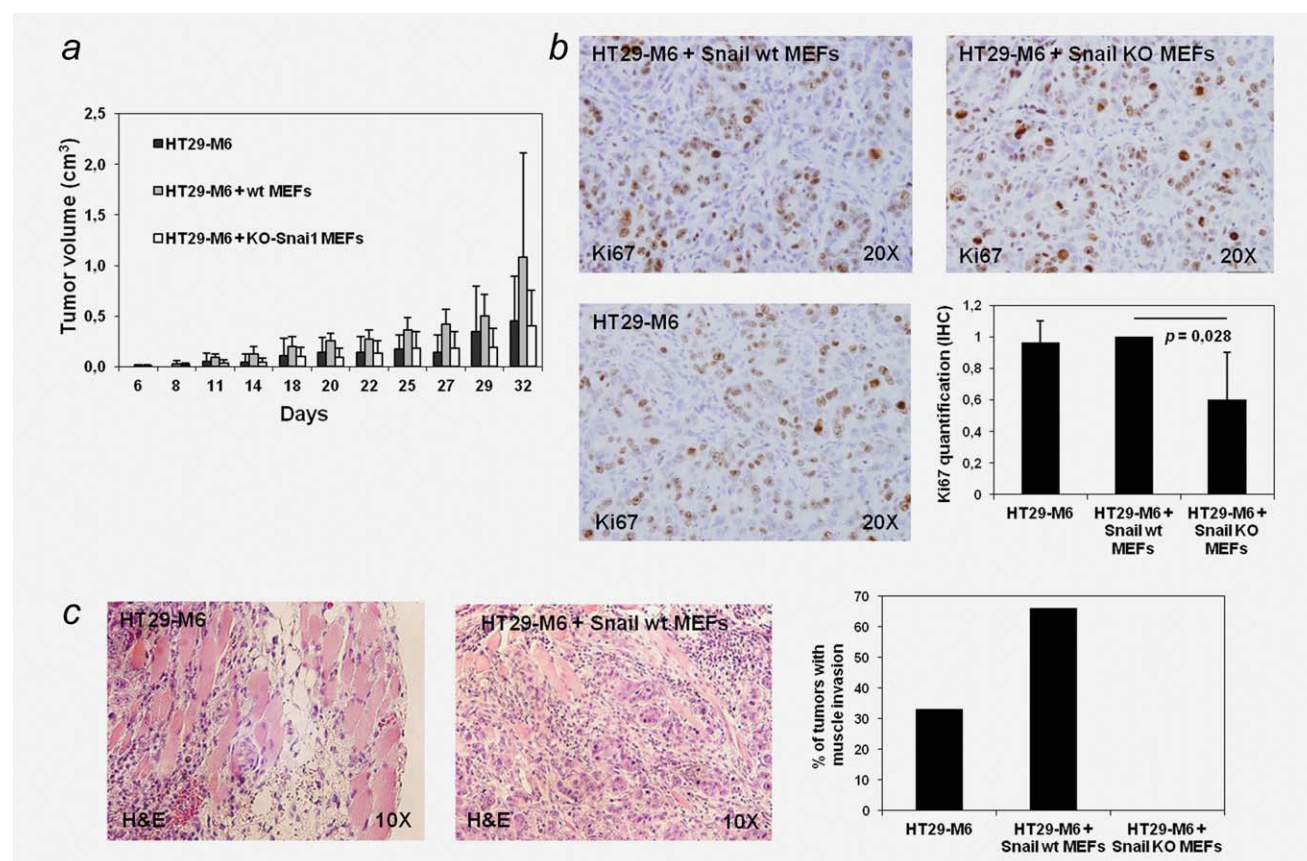


Figure 2. Snail1-expressing fibroblasts are required for the coadjuvant effect of these cells on colon cancer cell growth and invasion in co-implanted nude mice. Primary tumor growth was monitored for 32 days, showing a reduction of size in tumors derived from coinjection of tumor cells and Snail1 KO MEFs (a). There was a significant proliferation index, measured by Ki67 immunostaining, and a decrease in tumors derived from colon cells and Snail1 KO MEFs (b). Muscular layer invasion was observed only in tumors derived from coinjection of colon cells and WT MEFs (c).

primary human CAFs and its ability to induce colon cancer cell migration (Fig. 1d). This correlation was also validated when another colon cancer cell line, SW480-ADH, was used (Supporting Information Fig. 1D).

These results suggest that the upregulation of *SNAIL* in tumor stroma enhances colon cancer cell migration. Therefore, to verify this conclusion we used different fibroblast cells in which we ectopically manipulated Snail1 levels (Supporting Information Fig. 2A). Snail1 overexpression in 1.BR3.G human immortalized fibroblasts upregulated the capacity of these cells to increase the migration of SW480-ADH and LIM1215 cells over mock-transfected 1.BR3.G cells (Fig. 1e and Supporting Information Fig. 2B, respectively).

The effect of Snail1 depletion in fibroblasts was also analyzed. We took advantage of the availability of murine embryo fibroblasts (MEFs) derived from a mouse bearing a Snail1-floxed form of this gene (Supporting Information Fig. 2A).²⁰ After depletion of these genes by expression of Cre recombinase, the effect of wild-type (WT) and Snail1 KO MEFs on SW-480 ADH migration was determined. As shown in Figure 1f, SW480-ADH-Mock cell migration was significantly less when cocultured with Snail1 KO MEFs than when cocultured with WT MEFs. The different effect on colon cancer cell migration of WT and Snail KO MEFs was also confirmed when using HT29-M6 or LIM1215 cells (Supporting Information Figs. 2C and 2D).

The increase in migration of target cells when cocultured with cells in which Snail1 was ectopically expressed was not restricted to fibroblasts: Snail1 expression either in SW480-ADH-Snail or in HT-29-Snail colon cancer cells induced a significant increase in the migration of cocultured SW480-ADH Mock cells (Supporting Information Figs. 2E and 2F).

These experiments demonstrate that Snail1 expression induces paracrine promigratory effects on colon cancer cells. We also analyzed whether the proliferation rates of epithelial cells increased when cocultured with Snail1-expressing cells. For this, colon cells were cocultured in 0.4- μ m Boyden chambers with Snail1-expression or mock fibroblasts. Proliferation rate was measured at 3 and 6 days of the coculture by fluorescence. An increase in the SW480-ADH cell proliferation rate was observed when cocultured with 1.BR3.G-Snail1 human fibroblasts (Fig. 1g). SW480-ADH cell proliferation also increased when Snail1 was expressed in the same cells (Supporting Information Fig. 2G).

In line with these results, Snail1-expressing fibroblasts statistically increased the number of SW480-ADH Mock cells in the S/M phase (Supporting Information Fig. 2H). In parallel, CAFs from nine colon cancer patients, with large differences in their mRNA *SNAIL* expression levels, offered similar results. There was direct correlation between *SNAIL* levels of CAFs and the percentage of SW480-ADH cells in the S/M phase (Fig. 1h).

The *in vivo* significance of these findings was also explored in a xenograft mouse model. HT29M6 cells were subcutaneously coinjected with WT or Snail KO MEFs in six mice. As

expected, Snail1 immunostaining showed lower Snail1 expression in the stromal compartment of tumors derived from coinjection of HT29-M6 and Snail1 KO MEFs than in that of tumors in the control group (Supporting Information Fig. 3A). As shown in Figure 2a, tumors derived from coinjection of colon cells and Snail KO MEFs were significantly smaller than the tumors of the control group. Supporting these data, Ki67 immunostaining showed a significant proliferation index decrease in tumors from colon cells and Snail1 KO MEFs (Fig. 2b). Interestingly, muscular layer invasion was observed in 67% of tumors derived from coinjection of HT29-M6 and Snail1 WT MEFs, while no tumor from Snail1 KO MEFs showed muscular invasion (Fig. 2c). In line with these data, downregulation of E-cadherin was observed in tumors derived from colon cancer cells and Snail1 WT MEFs by immunohistochemistry (Supporting Information Fig. 3B). These results demonstrated that depletion of Snail from fibroblasts decreased their ability to support xenograft tumor growth and invasion and supported *in vitro* Snail-derived effects.

To identify mediators involved in Snail1-dependent paracrine signaling between fibroblasts and colon cancer cells, we investigated whether Snail1 expression in fibroblasts modifies the production and release of cytokines, growth factors and other immunomodulators. Thus, a human cytokine array with conditioned medium from 1.BR3.G-Snail1-transfected cells and 1.BR3.G-PCDNA3 as control was performed to analyze the protein concentration of 80 human secreted proteins. Four upregulated (GRO- α , MCP-3, Fractalkine and I-309) and two downregulated (IL-10 and G-CSF) cytokines were observed, indicating a cytokine change profile derived from Snail1 expression in fibroblasts (Fig. 3a).

These data suggest that the Snail-dependent paracrine effect on colon cancer cells may involve cytokine profile changes. Therefore, to verify the effect of these cytokines, SW480-ADH-Mock cells were incubated with corresponding recombinant proteins. Preliminary results showed an increase in SW480-ADH-Mock cell migration when cells were incubated with Fractalkine or MCP-3 recombinant proteins (Fig. 3b). Similarly, a trend toward statistical increase of SW480-ADH-Mock cell migration was observed when incubation was with I-309 or GRO- α (Fig. 3b).

Different approaches have attempted to validate further the association between Snail1 and cytokine expression. Thus, mRNA expression levels of Snail1 and target cytokines were analyzed in (i) eight CAFs with different *SNAIL* expression levels; (ii) Snail1 KO and WT MEFs; (iii) 1.BR3.G-Snail1-transfected cells and 1.BR3.G-PCDNA3 and (iv) human colon tumor tissues from 65 patients. Interestingly, MCP-3 and Snail1 expression levels are associated in all experimental approaches (Figs. 3c–3f). Remaining cytokines, such as GRO- α and Fractalkine, also showed statistical association with Snail1 expression levels, but not under all conditions (data not shown). Taken together, these data support the view that, at least, changes in mRNA and protein expression levels of MCP-3 are involved in the Snail1-dependent paracrine effect on colon cancer cells.

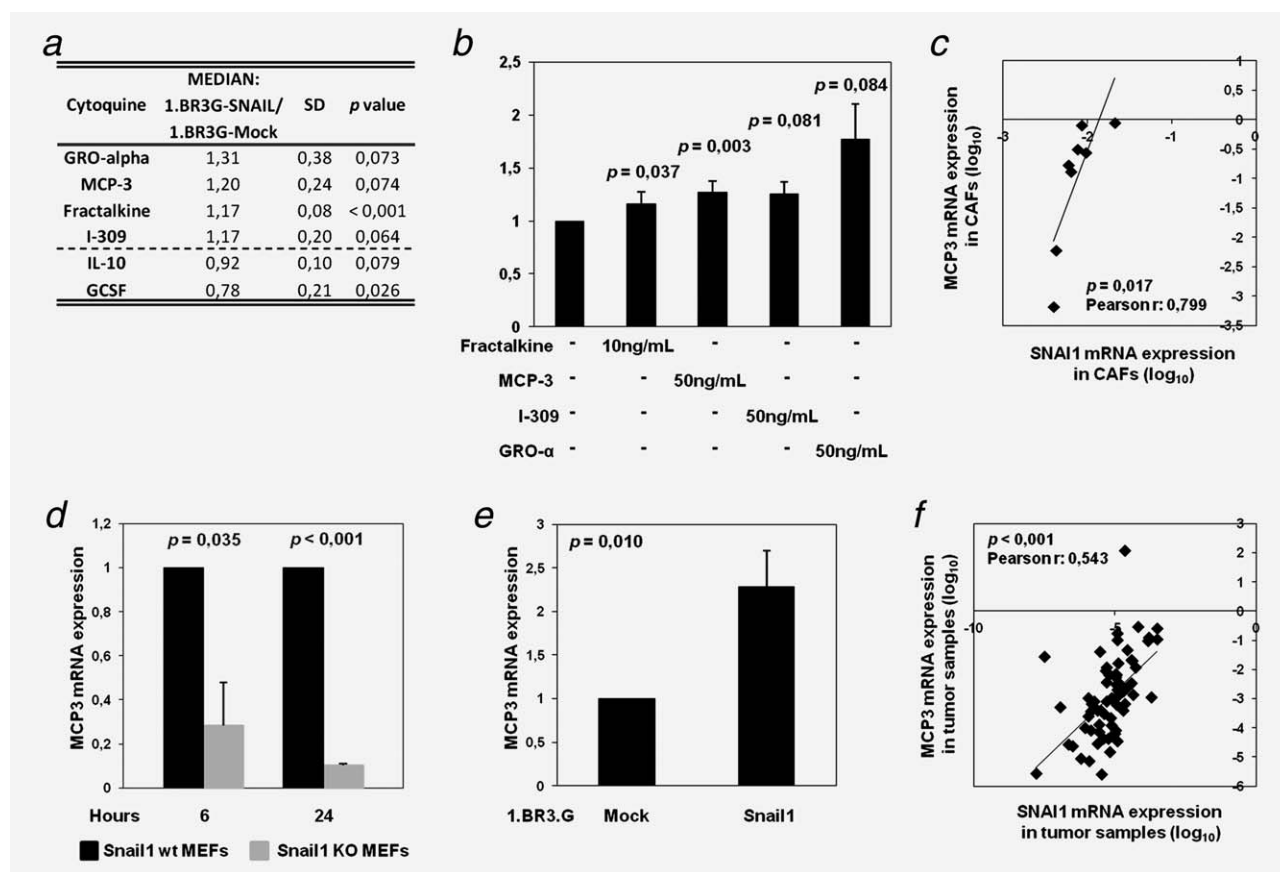


Figure 3. Association between MCP-3 and Snail1 expression levels in CAFs and human tumor tissues. Deregulated proteins in conditioned medium from 1.BR3G-Snail1 fibroblasts for Mock cells measured by human cytokine array. (a) There was a statistically significant increase in SW480-ADH-Mock tumor colon cell migration when cells were incubated with Fractalkine or MCP-3 cytokines. Although there was no statistical difference, there was an increase of SW480-ADH-Mock cell migration when cells were incubated with I-309 and GRO- α cytokines (b). Association between MCP-3 and SNAIL1 mRNA expression levels in human primary CAFs (c), in Snail1 KO and WT MEFs treated with TGF- β at different times (d), in 1.BR3.G-Snail1-transfected cells and 1.BR3.G-PCDNA3 (e) and in human colon tumor tissues from 65 patients (f).

In summary, the clinical implication of this study lies in the observation that *SNAIL1* expression is upregulated in the stroma of human colon cancer patients. Moreover, in human colon tumor samples, *SNAIL1* expression was associated with CAF markers, such as α -SMA and FAP, which have previously been related to colorectal cancer patient survival.¹⁸ In addition, the overlapping immunostaining of *SNAIL1* and CAF markers in parallel sections of tumor samples supports these data, which point to the expression of *SNAIL1* as a CAF marker. The identification of new markers for progression in colon and other cancers is essential for understanding the cross-talk between fibroblasts and cancer cells, which would identify new targets for developing novel strategies to interfere with cancer progression.

Our data describe a novel role of Snail1-derived paracrine effects on cancer cells. Thus, Snail expression in fibroblasts increases the tumorigenic abilities of cocultures of colon cancer cells by increasing cell migration and proliferation. Corroborative data were also obtained when Snail1 WT or knockout MEFs were used. In addition, data obtained from primary CAFs with similar results to results with cell lines indicate the relevance of *SNAIL1* expression in clinical settings. The *in vivo*

value of these findings is emphasized by the finding that coinjection of tumor cells with Snail KO fibroblasts developed smaller tumors with a lower proliferation index and less muscular invasion than coinjection with WT fibroblasts did. In contrast to our results, Snail1 expression has been related to a retard in cell proliferation.²¹ However, these studies were performed overexpressing Snail1 in epithelial cells, while our results analyze the relevance of Snail1 in fibroblasts and its effect on cocultured colon cells, demonstrating a novel paracrine effects of Snail1-expressing fibroblasts.

Analysis should be extended to identify the fibroblast-derived mediators of Snail1-dependent stimulatory *in vitro* effects. However, our results suggest that the paracrine effect of fibroblasts' Snail expression engages with cytokine profile changes. Indeed, the direct effect of some of these cytokines was assessed in the induction of colon tumor cell migration. Moreover, association between MCP-3 and Snail1 mRNA expression levels was confirmed under different experimental conditions, which suggest that this cytokine might be a mediator of Snail1-dependent paracrine effects of fibroblasts on cancer cell migration and proliferation.

In brief, the conclusions of our study demonstrate the importance of Snail1 expression in fibroblasts and CAFs, enhancing the protumorigenic abilities of colon cancer cells, in a way that involves cytokine profile changes.

Acknowledgements

M. EAUDE helped with the English text. Members of the FB laboratory contributed with constructive criticism throughout this project. This research

was supported by the PI12/02037, Fundación Científica AECC, SAF2010-20750, S2010/BMD-2344, RTICC-RD12/0036/0041 and by the Fundación Banco Santander. Antonio García de Herreros' laboratory was supported by RTICC-RD12/0036/0005 and SAF 2010-16089. M^a Jesús Larriba's laboratory was supported by RD12/0036/0021. Cristina Peña and José Miguel García are recipients of Miguel Servet Contracts from the Instituto de Salud Carlos III; and Vanesa García, of one from AECC. All authors state no conflicts of interest.

References

1. Nieto MA. The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011;27:347–76.
2. Acloque H, Adams MS, Fishwick K, et al. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest* 2009;119:1438–49.
3. Castro AC, Rosivatz E, Schott C, et al. Slug is overexpressed in gastric carcinomas and may act synergistically with SIP1 and Snail in the down-regulation of E-cadherin. *J Pathol* 2007;211:507–15.
4. DiMeo TA, Anderson K, Phadke P, et al. A novel lung metastasis signature links Wnt signaling with cancer cell self-renewal and epithelial-mesenchymal transition in basal-like breast cancer. *Cancer Res* 2009;69:5364–73.
5. Elloul S, Elstrand MB, Nesland JM, et al. Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer* 2005;103:1631–43.
6. Emadi BM, Soheili ZS, Schmitz I, et al. Snail regulates cell survival and inhibits cellular senescence in human metastatic prostate cancer cell lines. *Cell Biol Toxicol* 2010;26:553–67.
7. Kuphal S, Palm HG, Poser I, et al. Snail-regulated genes in malignant melanoma. *Melanoma Res* 2005;15:305–13.
8. Martin TA, Goyal A, Watkins G, et al. Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2005;12:488–96.
9. Vandewalle C, Comijn J, De CB, et al. SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res* 2005;33:6566–78.
10. Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D, et al. Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene* 2002;21:3241–6.
11. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2000;2:76–83.
12. Franci C, Gallen M, Alameda F, et al. Snail1 protein in the stroma as a new putative prognosis marker for colon tumours. *PLoS One* 2009;4:e5595.
13. Sugimachi K, Tanaka S, Kameyama T, et al. Transcriptional repressor snail and progression of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:2657–64.
14. Pena C, Garcia JM, Larriba MJ, et al. SNAIL expression in colon cancer related with CDH1 and VDR downregulation in normal adjacent tissue. *Oncogene* 2009;28:4375–85.
15. Peña C, García JM, Silva J, et al. E-cadherin and vitamin D receptor regulation by SNAIL and ZEB1 in colon cancer: clinicopathological correlations. *Hum Mol Genet* 2005;14:3361–70.
16. Herrera M, Islam AB, Herrera A, et al. Functional heterogeneity of cancer-associated fibroblasts from human colon tumors shows specific prognostic gene expression signature. *Clin Cancer Res* 2013;19:5914–26.
17. Franci C, Takkunen M, Dave N, et al. Expression of Snail protein in tumor-stroma interface. *Oncogene* 2006;25:5134–44.
18. Herrera M, Herrera A, Domínguez G, et al. Cancer-associated fibroblast and M2 macrophage markers together predict outcome in colorectal cancer patients. *Cancer Sci* 2013;104:437–44.
19. Räsänen K, Vaheri A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp Cell Res* 2010;316:2713–22.
20. Batlle R, Alba-Castellón L, Loubat-Casanovas J, et al. Snail1 controls TGF- β responsiveness and differentiation of mesenchymal stem cells. *Oncogene* 2013;32:3381–9.
21. Vega S, Morales AV, Ocana OH, et al. Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev* 2004;18:1131–43.

RESEARCH HIGHLIGHT

Snail1-expressing fibroblasts as a source of paracrine signals in colon cancer tumors

Alberto Herrera¹, Mercedes Herrera¹, Félix Bonilla², Antonio García de Herreros³, Cristina Peña¹

¹*Grupo de investigación en “Señalización celular en cáncer”, Hospital Universitario Puerta de Hierro de Majadahonda, Majadahonda, Madrid, 28222, Spain*

²*Centro de Estudios Biosanitarios, Madrid, 28029, Spain*

³*Programa de Recerca en Càncer, IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, 08003, Spain*

Correspondence: Cristina Peña Maroto

E-mail: cpena@idiphim.org

Received: November 12, 2014

Published online: November 25, 2014

The transcription factor Snail1 is involved in the acquisition of invasive properties during the epithelial-mesenchymal transition. Snail1 expression in tumor stroma is associated with lower specific survival in colon cancer patients. Nevertheless, the role of Snail1 expression in stroma has not been determined. Using human primary normal and cancer associated fibroblasts (CAFs), fibroblastic cell lines and xenografted models of colon cancer, we show that Snail1 expression in fibroblasts and CAFs enhances the tumorigenic capacity of colon cancer cells by altering the secretion of cytokines.

Keywords: Colon cancer; Microenvironment; Cancer Associated Fibroblasts; Snail1

To cite this article: Alberto Herrera, *et al.* Snail1-expressing fibroblasts as a source of paracrine signals in colon cancer tumors. *Can Cell Microenviron* 2014; 1: e417. doi: 10.14800/ccm.417.

Snail1 protein (SNAIL1) is a transcription factor for the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT), which is characterized by the loss of epithelial characteristics and the acquisition of mesenchymal traits such as greater motility^[1]. During embryo development Snail1 expression and EMT are observed at different stages, and they are required for numerous processes such as gastrulation and neural crest formation^[2]. In cancer cells, Snail1 represses E-cadherin gene (CDH1) and induces EMT, indicating its fundamental role in cancer progression^[3,4]. Snail1 expression together with different EMT characteristics are detected in different types of cancer as breast, prostate, lung, ovarian, melanoma, colon or esophageal cancers^[5–14]. In most cases, Snail1 correlates inversely with CDH1 expression^[6,15–17]. Indeed, overexpression of Snail1 or reduced CDH1 expression is associated with higher tumor grade, nodal metastasis and its associated with lower survival times in patients with different types of cancer^[3,4].

The tumor microenvironment has attracted attention as a therapeutic area because it plays an essential role in stimulation of tumorigenesis, controls tumor drug-uptake and sensitivity, and has an impact on prognosis. Moreover, there is growing evidence that the microenvironment also stimulates EMT, thereby enhancing the invasive properties of cancer^[18]. Fibroblasts are a major component of the stroma as well as one of the most active cell types. They contribute to tumor biology in several ways, such as extracellular matrix remodeling, the release of soluble factors, and the regulation of tumor cell motility, metabolism or implantation^[19–23]. Fibroblasts of the tumor stroma have received various names: tumor-associated fibroblasts, myofibroblasts or carcinoma-associated fibroblasts (CAFs), as we refer to them here^[24]. CAFs comprise a heterogeneous population of cells derived from several sources^[18]. The heterogeneity of CAFs may reflect the variety of their involvement in cancer progression. In an earlier study, we reported that the degree of activation

of CAFs, as measured by classical activated fibroblast markers, predicts outcome in colon cancer patients ^[25]. Moreover, a specific prognostic gene expression signature was derived from the functional heterogeneity of CAFs ^[26]. Exploring the heterogeneity of CAFs may help us to understand epithelial-stromal interactions, which could ultimately inform about cancer pathogenesis, natural history and future therapeutics.

We have previously reported that, in colon tumors, Snail1 expression is observed in cells with a fibroblast-like phenotype into the tumor stroma ^[11]. Furthermore, colon cancer patients with Snail1 expression in tumor stroma showed poor outcomes ^[11]. In parallel, we described the paracrine effects on human colorectal cells derived from Snail expression in neighboring tumor cells, showing down-regulation of *CDH1* and *VDR* expression when epithelial cells were co-cultured with Snail1 over-expressing colon cancer cells ^[17]. However, the molecular mechanisms underlying the association between Snail1 expression in the stroma and colon cancer patients' survival, or the derived paracrine mechanism generated by Snail1-expressing cells are not yet clear. Although many studies have focused on the effects of Snail1 expression in tumor cells, few have analyzed Snail1 expression in fibroblasts isolated from tumor stroma. Accordingly, in a recent study ^[27], we described colon cancer cell migration and proliferation enhancement driven by paracrine-derived effects of Snail1-expressing fibroblasts involving novel cytokine profile.

In the work by Herrera *et al.* ^[27], primary cultures of Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs) from colon cancer patients and fibroblasts from normal colon mucosa (NFs) were established to determine variation in Snail1 expression. Interestingly, CAFs showed higher Snail1 expression levels than fibroblasts from normal colon mucosa indicating that Snail1 can be considered a CAF marker. Furthermore, an association of Snail1 expression and other markers of CAFs such as α -SMA and FAP, was observed in normal and tumor samples of colon cancer patients, either by RNA analysis or by co-staining.

We have also followed alternative approaches to examine the pro-tumorigenic effects of Snail1 expression in fibroblasts on colon cancer cells, including *in vitro* migration models (with a set of colon cancer and fibroblast cells), primary CAFs and an *in-vivo* co-xenograft model. The data indicated that Snail1 expression in fibroblasts increases the tumorigenic capacity of co-cultured colon cancer cells to stimulate both cell migration and proliferation ^[27]. The enhanced migration response of target cells was not restricted to their co-culture with Snail1-expressing fibroblasts, since it was also observed in the presence of Snail1-transfected

epithelial cells. However, the increase in colon tumor cell migration was stronger when Snail1 was expressed by fibroblasts. These results are consistent with the decrease in E-Cadherin mRNA expression observed in colon cells co-cultured with Snail1-expressing cells ^[17]. This E-cadherin down-modulation, together with the increase in migration of colon cells co-cultured with Snail1-expressing fibroblasts, might indicate that fibroblasts induce EMT or partial EMT in colon epithelial cells.

On the other hand, the association between retarded cell proliferation and EMT has been described, since cell division is impaired in Snail1-expressing epithelial cells ^[28–30]. However, association with Snail1 and increase in proliferation has also been reported in other studies. Thus, down-regulation of E-cadherin together with increased proliferation are associated with Snail1 expression under hair-bud formation ^[31]. Nevertheless, in the studies by Nieto, Cano and co-workers Snail1 was over-expressed in epithelial cells, while we analyzed Snail1 in fibroblasts; the effect of Snail1 might not be the same in a different cellular background. Accordingly, Snail1 expression in fibroblasts does not retard cell growth ^[32,33].

A series of studies confirmed that Snail1 overexpression in epithelial cells enhances migration of different cell types, through the release of pro-inflammatory cytokines ^[34–36]. Although further studies are required to identify the fibroblast-derived mediators of Snail1-dependent stimulatory effects *in vitro*, these results indicate that, in fibroblasts, Snail1 expression induces the reprogramming of the cytokinome ^[17]. Therefore, Snail1 enhances MCP-3 expression in CAFs or fibroblastic cell lines, and the expression of both genes is associated in human colon cancer samples. Therefore, MCP-3 is a possible mediator of Snail1-dependent paracrine effects on cancer cell migration and proliferation ^[17]. Other studies support the relevance of this cytokine: for instance, metastatic colorectal cancer cell lines were characterized by higher expression of MCP-3/4 as compared to primary tumor cell lines ^[37]. MCP-3 has also been related with matrix invasion, lymph node metastasis and tumor node metastasis in gastric cancer ^[38]. In a co-culture of oral squamous carcinoma cells and CAFs, MCP-3 was up-regulated and promoted the invasion and migration of tumor cells ^[39]. Remarkably, shRNAs directed against MCP-3 suppressed tumorigenicity following co-injection of tumor cells and fibroblasts, since tumor cell proliferation is reduced to the same levels observed in derived tumors without fibroblasts co-injection ^[40].

Briefly, the study highlights the importance of Snail1 expression in CAFs and fibroblasts, enhancing the tumorigenic capacity of colorectal cancer cells, possibly

attributable to a change in the profile of secreted cytokines [27]. Although its role in epithelial cells has received more attention, various studies have analyzed the effects of Snail expression in the regulation of other cell types in the tumor microenvironment, such as fibroblasts or mesenchymal stem cells. For instance, Snail expression is required for the maintenance of mesenchymal stem cells, preventing differentiation to adipocytes or osteoblasts, and it controls the tumorigenic properties of these cells in the generation of sarcomas [32, 41]. Moreover, Snail is also required for the control of extracellular matrix architecture by fibroblasts, and to guide epithelial tumor migration [42]. Finally, tissue-invasive potential and angiogenesis induction is not detected in Snail-depleted fibroblasts [33].

All these findings emphasize the need to elucidate the cross-talk between fibroblast and cancer cells and to identify the cytokines involved. Moreover, inhibition of fibroblast-epithelial interactions represents a strategy for interference with cancer progression, encouraging the search for new therapies which could offer a synergistic effect with the current systemic therapies.

Conflict of interest

All authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

R. Rycroft helped with the English text. This research was supported by PI12/02037, the Fundación Científica AECC, SAF2010-20750, S2010/BMD-2344, RTICC-RD12/0036/0041, and by the Fundación Banco Santander. Antonio García de Herreros' laboratory was supported by RTICC-RD12/0036/0005 and SAF SAF2013-48849-C2-1-R. Cristina Peña is a recipient of Miguel Servet Contract from the Instituto de Salud Carlos III.

References

- Nieto MA. The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011; 27:347–376.
- Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest* 2009; 119:1438–1449.
- Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119:1420–1428.
- Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; 139:871–890.
- Alves CC, Rosivatz E, Schott C, Hollweck R, Becker I, Sarbia M, et al. Slug is overexpressed in gastric carcinomas and may act synergistically with SIP1 and Snail in the down-regulation of E-cadherin. *J Pathol* 2007; 211:507–515.
- Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D, Locascio A, Cano A, Palacios J, et al. Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene* 2002; 21:3241–3246.
- Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, et al. The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2000; 2:76–83.
- DiMeo TA, Anderson K, Phadke P, Feng C, Perou CM, Naber S, et al. A novel lung metastasis signature links Wnt signaling with cancer cell self-renewal and epithelial-mesenchymal transition in basal-like breast cancer. *Cancer Res* 2009; 69:5364–5373.
- Elloul S, Bukholt Elstrand M, Nesland JM, Tropé CG, Kvalheim G, Goldberg I, et al. Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer* 2005; 103:1631–1643.
- Emadi Baygi M, Soheili ZS, Schmitz I, Sameie S, Schulz WA. Snail regulates cell survival and inhibits cellular senescence in human metastatic prostate cancer cell lines. *Cell Biol Toxicol* 2010; 26:553–567.
- Francí C, Gallén M, Alameda F, Baró T, Iglesias M, Virtanen I, et al. Snail protein in the stroma as a new putative prognosis marker for colon tumours. Callaerts P, editor. *PLoS ONE* 2009; 4:e5595.
- Kuphal S, Palm HG, Poser I, Bosserhoff AK. Snail-regulated genes in malignant melanoma. *Melanoma Res* 2005; 15:305–313.
- Martin TA, Goyal A, Watkins G, Jiang WG. Expression of the transcription factors Snail, Slug, and Twist and their clinical significance in human breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2005; 12:488–496.
- Vandewalle C, Comijn J, De Craene B, Vermassen P, Bruyneel E, Andersen H, et al. SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res* 2005; 33:6566–6578.
- Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, et al. The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2000; 2:84–89.
- Peña C, García JM, Silva J, García V, Rodríguez R, Alonso I, et al. E-cadherin and vitamin D receptor regulation by SNAIL and ZEB1 in colon cancer: clinicopathological correlations. *Hum Mol Genet* 2005; 14:3361–3370.
- Peña C, García JM, Larriba MJ, Barderas R, Gómez I, Herrera M, et al. SNAIL expression in colon cancer related with CDH1 and VDR downregulation in normal adjacent tissue. *Oncogene* 2009; 28:4375–4385.
- Augsten M, Hägglöf C, Peña C, Östman A. A digest on the role of the tumor microenvironment in gastrointestinal cancers. *Cancer Microenviron* 2010; 3:167–176.
- Beacham DA, Cukierman E. Stromagenesis: The changing face of fibroblastic microenvironments during tumor progression. *Semin Cancer Biol* 2005; 15:329–341.
- Gout S, Huot J. Role of cancer microenvironment in metastasis: focus on colon cancer. *Cancer Microenviron* 2008; 1:69–83.
- Orimo A, Weinberg RA. Stromal fibroblasts in cancer: a novel

- tumor-promoting cell type. *Cell Cycle* 2006; 5:1597–1601.
22. Qian B-Z, Pollard JW, Qian B-Z, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 2010; 141:39–51.
23. Sugimoto H, Mundel TM, Kieran MW, Kalluri R. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther* 2006; 5:1640–1646.
24. Xouri G, Christian S. Origin and function of tumor stroma fibroblasts. *Semin Cell Dev Biol* 2010; 21:40–46.
25. Herrera M, Herrera A, Domínguez G, Silva J, García V, García JM, et al. Cancer-associated fibroblast and M2 macrophage markers together predict outcome in colorectal cancer patients. *Cancer Sci* 2013; 104:437–444.
26. Herrera M, Islam ABMMK, Herrera A, Martin P, Garcia V, Silva J, et al. Functional heterogeneity of cancer-associated fibroblasts from human colon tumors shows specific prognostic gene expression signature. *Clin Cancer Res* 2013; 19:5914–5926.
27. Herrera A, Herrera M, Alba-Castellón L, Silva J, García V, Loubat-Casanovas J, et al. Protumorigenic effects of Snail-expression fibroblasts on colon cancer cells. *Int J Cancer* 2014; 134:2984–2990.
28. Peinado H, Quintanilla M, Cano A. Transforming growth factor β -1 induces Snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem* 2003; 278:21113–21123.
29. Valdés F, Álvarez A M, Locascio A, Vega S, Herrera B, Fernández M, et al. The epithelial mesenchymal transition confers resistance to the apoptotic effects of transforming growth factor β in fetal rat hepatocytes. *Mol Cancer Res* 2002; 1:68–78.
30. Vega S, Morales AV, Ocaña OH, Valdés F, Fabregat I, Nieto MA. Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev* 2004; 18:1131–1143.
31. Jamora C, Lee P, Kocieniewski P, Azhar M, Hosokawa R, Chai Y, et al. A signaling pathway involving TGF- β 2 and Snail in hair follicle morphogenesis. *PLoS Biol* 2005; 3:e11.
32. Batlle R, Alba-Castellón L, Loubat-Casanovas J, Armenteros E, Francí C, Stanisavljevic J, et al. Snail1 controls TGF- β responsiveness and differentiation of mesenchymal stem cells. *Oncogene* 2013; 32:3381–3389.
33. Rowe RG, Li X-Y, Hu Y, Saunders TL, Virtanen I, de Herreros AG, et al. Mesenchymal cells reactivate Snail1 expression to drive three-dimensional invasion programs. *J Cell Biol* 2009; 184:399–408.
34. Hsu DS-S, Wang H-J, Tai S-K, Chou C-H, Hsieh C-H, Chiu P-H, et al. Acetylation of Snail modulates the cytokinome of cancer cells to enhance the recruitment of macrophages. *Cancer Cell* 2014; 26:534–548.
35. Hwang W, Yang M, Tsai M, Lan H, Su S, Chang S, et al. SNAIL regulates interleukin-8 expression, stem cell-like activity, and tumorigenicity of human colorectal carcinoma Cells. *Gastroenterology* 2011; 141:279–291.e5.
36. Knab LM, Ebine K, Chow CR, Raza SS, Sahai V, Patel AP, et al. Snail cooperates with KrasG12D in vivo to increase stem cell factor and enhance mast cell infiltration. *Mol Cancer Res* 2014; 12:1440–1448.
37. Abajo A, Bitarte N, Zarate R, Boni V, Lopez I, Gonzalez-Huarriz M, et al. Identification of colorectal cancer metastasis markers by an angiogenesis-related cytokine-antibody array. *World J Gastroenterol* 2012; 18:637–645.
38. Hwang TL, Lee LY, Wang CC, Liang Y, Huang SF, Wu CM. CCL7 and CCL21 overexpression in gastric cancer is associated with lymph node metastasis and poor prognosis. *World J Gastroenterol* 2012; 18:1249–1256.
39. Jung D-W, Che ZM, Kim J, Kim K, Kim K-Y, Williams D, et al. Tumor-stromal crosstalk in invasion of oral squamous cell carcinoma: a pivotal role of CCL7. *Int J Cancer* 2010; 127:332–344.
40. Rajaram M, Li J, Egeblad M, Powers RS. System-wide analysis reveals a complex network of tumor-fibroblast interactions involved in tumorigenicity. Horwitz MS, editor. *PLoS Genet* 2013; 9:e1003789.
41. Alba-Castellón L, Batlle R, Francí C, Fernández-Aceñero MJ, Mazzolini R, Peña R, et al. Snail1 expression is required for sarcomagenesis. *Neoplasia* 2014; 16:413–421.
42. Stanisavljevic J, Loubat-Casanovas J, Herrera M, Luque T, Peña R, Lluch A, et al. Snail1-expressing fibroblasts in the tumor microenvironment display mechanical properties that support metastasis. *Cancer Res*, in press.

The emerging role of Snail1 in the tumor stroma

A. Herrera¹ · M. Herrera¹ · C. Peña¹

Received: 17 November 2015 / Accepted: 8 December 2015
© Federación de Sociedades Españolas de Oncología (FESEO) 2015

Abstract The transcription factor Snail1 leads to the epithelial–mesenchymal transition by repressing the adherent and tight junctions in epithelial cells. This process is related to an increase of cell migratory and mesenchymal properties during both embryonic development and tumor progression. Although Snail1 expression is very limited in adult animals, emerging evidence has placed Snail at the forefront of medical science. As a transcriptional repressor, Snail1 confers cancer stem cell-like traits on tumor cells and promotes drug resistance, tumor recurrence and metastasis. In this review, we summarize recent reports that suggest the pro-tumorigenic roles of Snail1 expression in tumor stroma. The crosstalk between tumor and stromal cells mediated by Snail1 regulates paracrine communication, pro-tumorigenic abilities of cancer cells, extracellular matrix characteristics and mesenchymal differentiation in cancer stem cells and cancer-associated fibroblasts. Therefore, understanding the regulation and functional roles of Snail1 in the tumor microenvironment will provide us with new therapies for treating metastatic disease.

Keywords Snail1 · Cancer microenvironment · Cancer-associated fibroblasts · Extracellular matrix · Stem cells · Paracrine signals

Snail1 involvement in embryogenesis and tumor progression

The activity of the Snail family members of zinc-finger transcription factors is required in various developmental processes, such as the formation of the neural crest and the mesoderm during embryogenesis in both vertebrate and invertebrate embryos [1]. The first member of the Snail family, Snail1, was described in *Drosophila melanogaster*, in which it acts as a repressor of neuroectodermal genes and, as such, is essential to mesoderm invagination and neural crest formation [2, 3].

In mammals, the Snail1 gene is necessary in early development, since homozygous knockout of Snail1 in mice fails to produce the mesoderm and mice die at gastrulation. During late development, neural crest-specific Snail1 deletion on a Snail2^{-/-} background in mice embryos results in cleft palates and multiple craniofacial defects [4].

Taken together, these data point to Snail1 as a master regulator of neural precursor numbers, suggesting that these mechanisms are well conserved throughout evolution, from organisms like *Drosophila* to mammals.

In addition, Snail1 plays a major role inhibiting the entry of cells into a differentiation process, a critical step in tissue development. Thus, there are significantly fewer Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells (BMMSCs) when Snail1 is depleted in conditional knockout adult animals. In culture, Snail1-deficient BMMSCs prematurely differentiate to osteoblasts or adipocytes and, unlike controls, are resistant to the TGF-β1-induced differentiation block [5].

On the other hand, epithelial–mesenchymal transition (EMT) is a process in which cells lose their epithelial traits to acquire mesenchymal characteristics [6]. The Snail1

✉ C. Peña
cpena@idiphim.org

¹ “Cancer Cell Signaling” Research Group, Hospital Universitario Puerta de Hierro de Majadahonda, Majadahonda, Madrid, Spain

protein is able to initiate EMT, regulating the loss of epithelial characteristics and the acquisition of mesenchymal traits such as greater motility [7].

Although EMT was first recognized as a feature of embryogenesis, vital for morphogenesis during embryonic development, recently the link between EMT and tumor metastasis has been well established [8]. Thus, the repression of the E-cadherin gene (CDH1) and the induction of EMT by Snail1 are found in cancer cells, indicating the latter's fundamental role in cancer progression [9, 10]. Snail1 expression together with various EMT characteristics is detected in several types of cancer, including breast, prostate, lung, ovarian, melanoma, colon and esophageal cancers [11–20]. In most cases, Snail1 correlates inversely with CDH1 expression [12, 21, 22]. Indeed, overexpression of Snail1 or reduced CDH1 expression is associated with higher tumor grade and nodal metastasis. It is also associated with lower survival times in patients with various types of cancer [9, 10, 23].

Snail1 in tumor stroma

The normal cell stroma includes a structural and functional support, known as the extracellular matrix (ECM), which brings together a variety of cells, including fibroblasts, myofibroblasts, smooth muscle cells, pericytes, endothelia and a variable population of inflammatory cells [24].

Fibroblasts in normal tissues repair tissue under certain physiological conditions [25]. During fibrosis, fibroblasts differentiate to myofibroblasts, a kind of specialized fibroblast with strong contractility mediated by the expression of α -Smooth Muscle Actin cytoskeleton protein (α -SMA). In solid tumors, fibroblasts are one of the most abundant components in the stroma, receiving various names: myofibroblasts, Tumor-Associated Fibroblasts (TAFs) or Carcinoma-Associated Fibroblasts (CAFs) [26]. CAFs are characterized by the expression of various proteins, such as α -SMA, Fibroblast Activation Protein (FAP), Fibroblast-Specific Protein 1 (FSP1) and growth and angiogenic factors. Although local and tissue-resident fibroblasts are thought to be one of the most immediate sources of CAFs, CAFs include a heterogeneous population of cells derived from different sources: resident fibroblasts, bone marrow-derived progenitor cells, endothelial or cancer cells through endothelial/epithelial–mesenchymal transition, smooth muscle cells, pericytes, adipocytes or inflammatory cells [27]. The CAF heterogeneity described, with a variety of morphological features and physiological functions [28], may reflect the variation of CAF involvement in cancer progression. In a recent study, different CAF sub-types were established in patients with primary colon carcinomas, depending on their ability to promote

migration of colon cancer cells, the different features of the activation state and, thus, some molecular expression signatures associated with patient survival [29]. The protein expression pattern in CAFs from liver metastasis of colorectal cancer is similar to the resident liver fibroblast phenotype, suggesting a possible common origin for tissue fibroblasts and fibroblasts present in metastatic foci [30].

Unlike normal fibroblasts activated in inflammatory conditions or during wound healing [31, 32], CAFs promote the development and progression of primary tumors through different mechanisms: releasing soluble factors, remodeling the ECM, regulating tumor cell motility, tumor cell implantation or controlling tumor metabolism [33–37].

To date, analyses of Snail1 function in mammalian cells have focused on the ability of the transcription factor to initiate the transdifferentiation of normal or neoplastic epithelial cells, but few studies have analyzed the inflammatory or pro-tumorigenic effects of Snail1 expression on the stromal compartment.

Fibroblasts express high levels of Snail1 protein in some normal and pathological situations, although adult fibroblasts normally do not express Snail1. During wound healing of skin, Snail1 expression was detected in spindle-shaped cells of the granulation tissue in the proliferative phase (days 3 and 5). In addition, wound closure was delayed in Snail1 KO mice [38, 39]. In fibromatoses, fibrosarcomas and sarcomas, Snail1 protein was observed in nuclei of fibroblast cells. Ectopic Snail1 expression in fibroblasts increased sarcoma formation when injected subcutaneously in mice [38, 40]. The expression of Snail1 was also higher in synovium and synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis [41]. Furthermore, a Gene Ontology (GO) analysis demonstrated that Snail1 governs multiple processes that are critical to fibroblast motile behavior, including adhesion, migration and proteolysis [42].

The importance of Snail1 expression in tumor stroma has been put forward in numerous studies. In early breast-infiltrating carcinomas, the presence of Snail1 in the tumor stroma is associated with lymph node metastasis and links to poor Overall Survival (OS), while there are no significant differences in OS for Snail1 expression in tumor cells [39]. Fibroblast Snail1 expression predicts outcome of colon cancer patients. In colon adenocarcinomas and adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract, positive fibroblasts for Snail1 expression were detected in areas of invasion or mucosal erosion and ulceration [17, 43]. Moreover, in Gastrointestinal Stromal Tumors (GISTs) with distant metastasis, Snail1 protein expression was significantly higher than in GISTs without distant metastasis [44]. In pharyngeal squamous cell carcinomas, the presence of Snail1 in tumor stromal myofibroblasts seems to be a predictor of poor survival, rather than Snail1

expression in malignant epithelial tumor cells [45]. In the tumor microenvironment of phenotypically aggressive Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC), tumor-budding cells are surrounded by stromal cells expressing high levels of the E-cadherin repressors Zeb1, Zeb2 and Snail1. In addition, nuclear Snail1 and Twist1 expression was seen mostly in stromal cells and rarely in tumor-budding cells [46].

Snail1 is also expressed in embryonic fibroblast cell lines and in primary cultured CAFs from colorectal cancer patients and from human gastric tumor tissues, while no expression is found in adult skin fibroblasts or in myoblast cells [5, 38, 40, 47–49]. In addition, direct association between Snail1 protein levels in fibroblasts and CAF markers, such as α -SMA, FSP-1 and FAP, was observed [39, 47, 50]. Thus, these data suggest that Snail1 is a fibroblast activated marker.

On the basis of these data, it is reasonable to conclude that the presence of Snail1 protein in the tumor stroma, rather than in epithelial cells, seems to have a robust prognostic value.

Role of Snail1 expression in tumor stroma

Snail expression in fibroblasts as a modulator of paracrine signals

In tumor microenvironments, CAF behavior is similar to the physiological response to tissue damage and inflammatory stimuli. This is in line with the view of cancer as “a wound that never heals” [51]. Thus, paracrine signaling supports both epithelial cell restoration after injury, in the case of myofibroblastic niches, and the development and progression of cancer in the case of CAF niches.

Therefore, up-regulation of Snail1 in fibroblast cell lines and CAF lines in colon cancer patients enhances colon cancer cell migration and proliferation through paracrine signaling. Additionally, tumors derived from co-injection of colon cells and Snail1 KO Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) were significantly smaller than the tumors of the control group. Interestingly, no muscular layer invasion was observed in tumors caused by co-injection with Snail1 KO MEFs [47]. Thus, changes in the cytokine profile of Snail1-expressing fibroblasts may affect the surrounding cells and modify their functional features. Several studies support this hypothesis: TNF- α stimulation or activation of Wnt signaling up-regulated the expression of Snail1, CDH-11 and α -SMA in synovial fibroblasts with an enhanced production of IL-6 [41]. The release of IL-17 mediated by Snail1 inhibited adipocyte differentiation through down-regulation of the Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F Member 6 (Nr2f6) [49]. Conditioned medium from

fibroblasts expressing Snail1 ectopically revealed the up-regulation of four secreted proteins (GRO- α , MCP-3, Fractalkine and I-309) and two down-regulated (IL-10 and G-CSF) cytokines. MCP-3 was shown to induce migration of colon cancer cells. Interestingly, a statistically significant association between MCP-3 and Snail1 expression levels was found in both fibroblast cell lines and CAFs from colon cancer patients [47].

Taken together, these data support the view that Snail1 activity controls migration, proliferation and differentiation of cells through paracrine signaling.

ECM regulation by Snail expression in fibroblasts

In addition to the production of soluble factors, CAFs also promote tumor progression and metastasis by modifying ECM properties. It has been recently demonstrated that some cytokines, such as TGF- β [39], TNF- α [41] or PDGF-BB [42], activate fibroblasts, which are capable of remodeling the extracellular matrix in a Snail1-dependent manner by promoting ECM deposition accompanied by ECM degradation and increasing stiffness with anisotropic orientation of ECM fibers.

In particular, Snail1 plays an important role in ECM composition by modifying the secretion or degradation of ECM molecules, such as collagen and fibronectin. Fibroblasts or Mesenchymal Stem Cells (MSCs) expressing Snail1 are more able to degrade collagen or mobilize invadopodia-like structures. A downstream effector of Snail1, MT1-MMP, has been shown to control MSC invasion and collagen degradation [42, 52].

In accordance with these collagenolytic features, invadopodial clusters of MT1-MMP and cortactin located at the fibroblast–collagen interface are reduced in Snail1-deficient cells [42]. On the other hand, collagen I activated the DDR2 receptor stimulating ERK2 activity that induced Snail1 stabilization, which sustained collagen synthesis and MT1-MMP production [53–55]. The majority of human invasive ductal breast carcinomas expressed DDR2; most of these were positive for nuclear Snail1 expression in ducts and had increased collagen deposition. These patients had worse survival rates, but no difference in DDR2 expression and lymph node involvement was found [55].

Fibronectin and LOX are also ECM proteins, produced by direct binding of Snail1 to their promoters as a co-activator of p65-NFKB [56]. Moreover, LOX, the collagen crosslinking enzyme, is also essential for the rigidity of the ECM generated by MFs and increases in a Snail1-dependent manner [39].

The Snail1 effects for the anisotropic orientation of ECM fibers are dependent on the RhoA/ α -SMA axis, necessary for the formation of cytoskeletal structures that sustain cell contacts and fibronectin fibrillogenesis. Indeed,

Snail1 expression in the tumor stroma induces local anisotropic fibronectin and collagen alignment in early breast-infiltrating carcinomas, which is associated with poor overall survival and lymph node involvement [39].

Cell differentiation is mediated by Snail expression

Physiologically, stem cells are the basis for tissue homeostasis in the adult organism. Furthermore, BMMSCs are also believed to be a source of CAFs, as BMSCs can be recruited into tumors and differentiate into them. Among the BMMSCs, MSCs share CAF features such as high expression of α -SMA and type-I collagen [57]. Moreover, stemness markers and osteoblast cell differentiation have been observed in CAFs [29].

Snail1 depletion decreased both the number of BMMSCs in vivo and the expression of MSC markers,

accelerating their differentiation to osteoblasts or adipocytes. On the other hand, Snail1-deficient BMMSCs proliferate at normal rates, with no changes observed in apoptosis under serum-free conditions. Furthermore, though Snail1 promotes a motile phenotype in epithelial cells, Snail1-deleted MSCs migrate at rates comparable to wild-type cells in a two-dimensional wound assay [52]. Recently, a number of studies have provided evidence of a role for Snail1 in the preservation of stem cell function. Embryonic cells fail to express either Snail1 or FSP-1 protein when isolated from FAK^{-/-} mice. These cells are more closely aligned to epithelial cells in terms of both gene expression and behavior. Additionally, Snail1 protein stabilization triggered by FAK rescue, in FAK-null embryonic cells, generates embryonic fibroblasts by reestablishing the mesenchymal characteristics via the ERK and Akt-dependent signaling cascade. These data

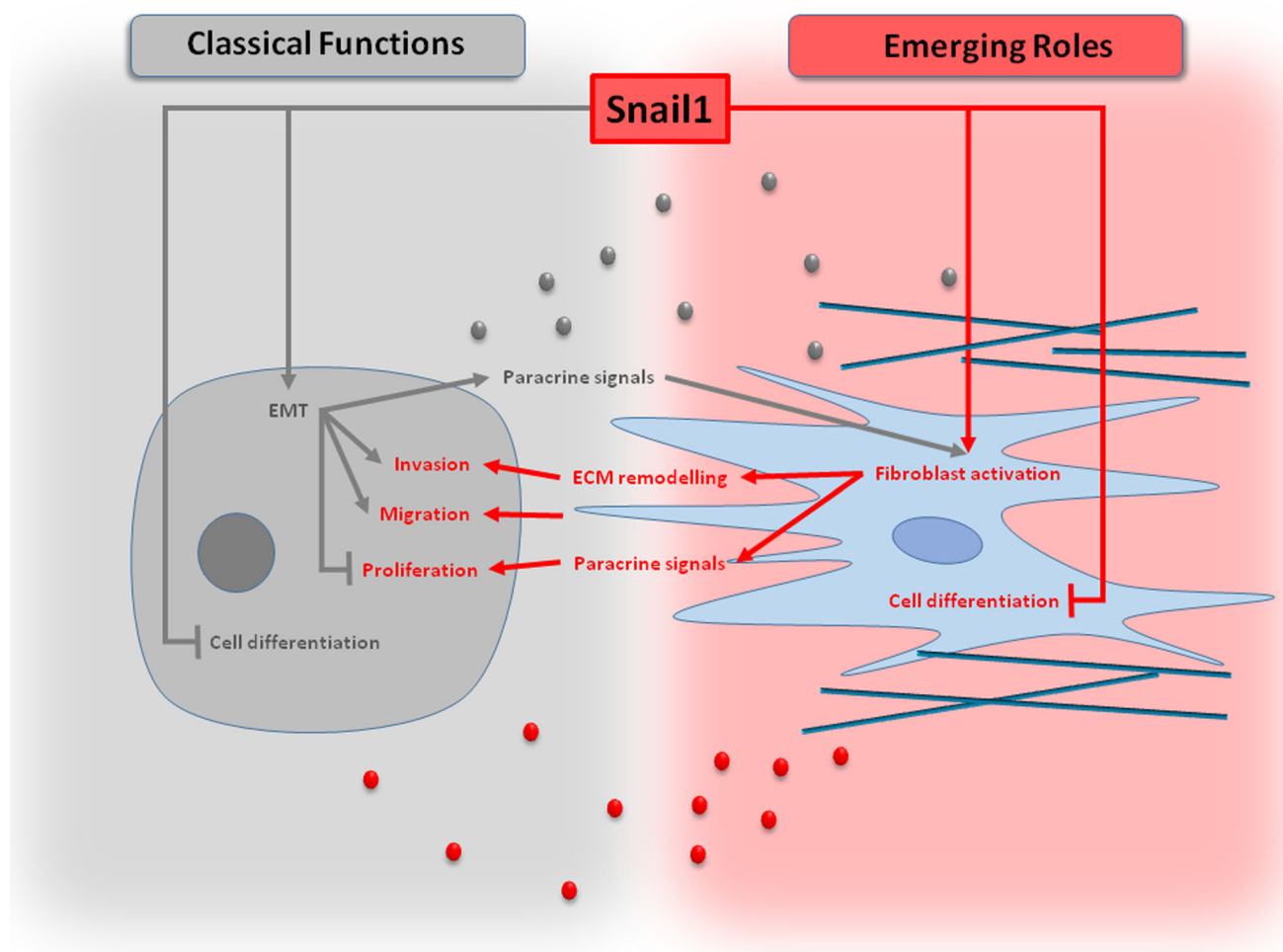


Fig. 1 New roles of Snail1 expression in stromal cells. Snail1 is now thought to play fundamental functions for tumor progression and metastasis when expressed in stromal cells, such as fibroblasts or MSCs. External stimuli induce Snail1 expression, activating fibroblasts and impairing cell differentiation which result in the ECM

remodeling and in a paracrine signaling feedback. Both ECM molecules and secreted proteins create a paracrine loop that induce the migration, invasion and proliferation of tumor epithelial cells and, therefore, enhance the tumor progression

identify FAK as a novel regulator of Snail1-dependent EMT in embryonic cells [58].

Moreover, up-regulation of Snail1 is sufficient to block differentiation of 3T3-L1 to adipocytes [5, 59], C2C12 to myotubes [60] and MSCs to osteoblasts or adipocytes [5]. It has been suggested that this Snail1 effect on adipogenesis and osteogenic differentiation could be mediated by activation of PI3 K/AKT, among other pathways [5]. Additionally, recent reports suggest that Snail1 inhibits adipocyte differentiation through down-regulation of Nr2f6, promoting the synthesis of the anti-adipogenic cytokine IL-17 [49]. The osteoblast differentiation process is mediated by Snail1 through the inhibition of different proteins including Runx2 and vitamin D receptor [60]. In vivo, fibroblasts differentiate to initiate neovessel formation during wound healing [61], but Snail1-deficient embryonic cells demonstrate a significantly attenuated ability to induce neovascularization [42].

Therefore, these results indicate that Snail1 is necessary for the maintenance, via different routes, of the number of MSCs and the undifferentiated phenotype, and that it regulates MSC activity by controlling tissue-invasive and proangiogenic functions.

Concluding remarks

It is now widely accepted that carcinomas must be seen as a complex tissue where signals derived from the stroma play a relevant role in the progression of the disease. The crosstalk established between tumoral and stromal compartments has been confirmed, suggesting mutual cooperation between fibroblasts and tumor cells with a bi-directional paracrine loop that eventually enhances tumor progression.

Here, we propose the idea that Snail1-expressing fibroblasts enhance the dynamic tumor microenvironment crosstalk required for the onset of metastasis in three different ways: (1) the modification of the secretome profile, (2) the orchestration of ECM characteristics and induction of a fibrillar network (desmoplasia) and (3) the regulation of cell differentiation (Fig. 1).

Further clarification of the molecular mechanisms underlying tumor–stroma interactions mediated by Snail-expressing fibroblasts may yield novel therapeutic targets for solid tumors. Many relevant pathways for cell survival, such as Akt or FAK pathways, are reported to be connected with Snail1. Although, various drugs to inhibit these pathways are currently being tested in clinical trials, blocking directly Snail1, which is not expressed in adult cells, but plays an important role in the onset of metastasis, could lead to lower toxicity with better results for patient treatments. Therefore, targeted therapy to the stromal compartment, or more specifically to Snail1 expression, is

expected to be clinically promising, enabling better patient stratification and eventually leading to more successful, individualized therapy.

Acknowledgments M. Eade helped with the English text. This research is supported by PI12/02037, RD12/0036/0041 from the Instituto de Salud Carlos III-FEDER; by the Fundación Científica AECC; by SAF2010-20750 from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain-FEDER; by S2010/BMD-2344 from the Comunidad de Madrid; and by the Fundación Banco Santander. Cristina Peña is a recipient of a Miguel Servet Contract from the Instituto de Salud Carlos III. All authors state no conflicts of interest. We thank lab members for help and advice throughout this research.

Compliance with ethical standards

This manuscript does not contain clinical studies or patient data. Thus, statements about “Informed consent” or “Research involving Human Participants and/or Animals” are not applicable.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3:155–66.
2. Alberga A, Boulay JL, Kempe E, Dennefeld C, Haenlin M. The snail gene required for mesoderm formation in *Drosophila* is expressed dynamically in derivatives of all three germ layers. *Dev Camb Engl.* 1991;111:983–92.
3. Hemavathy K, Hu X, Ashraf SI, Small SJ, Ip YT. The repressor function of snail is required for *Drosophila* gastrulation and is not replaceable by Escargot or Worniu. *Dev Biol.* 2004;269:411–20.
4. Murray SA, Oram KF, Gridley T. Multiple functions of Snail family genes during palate development in mice. *Development.* 2007;134:1789–97.
5. Batlle R, Alba-Castellón L, Loubat-Casanovas J, Armenteros E, Francí C, Stanisavljevic J, et al. Snail1 controls TGF- β responsiveness and differentiation of mesenchymal stem cells. *Oncogene.* 2013;32:3381–9.
6. Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial–mesenchymal transitions. *J Clin Invest.* 2009;119:1429–37.
7. Nieto MA. The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011;27:347–76.
8. Tse JC, Kalluri R. Mechanisms of metastasis: epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment. *J Cell Biochem.* 2007;101:816–29.
9. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial–mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009;119:1420–8.
10. Thierry JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial–mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009;139:871–90.
11. Alves CC, Rosivatz E, Schott C, Hollweck R, Becker I, Sarbia M, et al. Slug is overexpressed in gastric carcinomas and may act synergistically with SIP1 and Snail in the down-regulation of E-cadherin. *J. Pathol.* 2007;211:507–15.
12. Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D, Locascio A, Cano A, Palacios J, et al. Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene.* 2002;21:3241–6.
13. Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, et al. The transcription factor Snail controls epithelial–mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol.* 2000;2:76–83.
14. DiMeo TA, Anderson K, Phadke P, Feng C, Perou CM, Naber S, et al. A novel lung metastasis signature links Wnt Signaling with cancer cell self-renewal and epithelial–mesenchymal transition in basal-like breast cancer. *Cancer Res.* 2009;69:5364–73.
15. Elloul S, Bukholt Elstrand M, Nesland JM, Tropé CG, Kvalheim G, Goldberg I, et al. Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer.* 2005;103:1631–43.
16. Emadi Baygi M, Soheili ZS, Schmitz I, Sameie S, Schulz WA. Snail regulates cell survival and inhibits cellular senescence in human metastatic prostate cancer cell lines. *Cell Biol Toxicol.* 2010;26:553–67.
17. Francí C, Gallén M, Alameda F, Baró T, Iglesias M, Virtanen I, et al. Snail1 Protein in the Stroma as a New Putative Prognosis Marker for Colon Tumours. In: Callaerts P, editor. *PLoS One.* 2009;4:e5595.

18. Kuphal S, Palm HG, Poser I, Bosserhoff AK. Snail-regulated genes in malignant melanoma. *Melanoma Res.* 2005;15:305–13.
19. Martin TA, Goyal A, Watkins G, Jiang WG. Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2005;12:488–96.
20. Vandewalle C. SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell–cell junctions. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:6566–78.
21. Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, et al. The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol.* 2000;2:84–9.
22. Peña C, García JM, Larriba MJ, Barderas R, Gómez I, Herrera M, et al. SNAI1 expression in colon cancer related with CDH1 and VDR downregulation in normal adjacent tissue. *Oncogene.* 2009;28:4375–85.
23. Peña C, García JM, Silva J, García V, Rodríguez R, Alonso I, et al. E-cadherin and vitamin D receptor regulation by SNAI1 and ZEB1 in colon cancer: clinicopathological correlations. *Hum Mol Genet.* 2005;14:3361–70.
24. Worthley DL, Giraud AS, Wang TC. Stromal fibroblasts in digestive cancer. *Cancer Microenviron.* 2010;3:117–25.
25. Kerbel R, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:727–39.
26. Xouri G, Christian S. Origin and function of tumor stroma fibroblasts. *Semin Cell Dev Biol.* 2010;21:40–6.
27. Allen M, Louise Jones J, Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *J. Pathol.* 2011;223:163–77.
28. Augsten M, Hägglöf C, Peña C, Östman A. A digest on the role of the tumor microenvironment in gastrointestinal cancers. *Cancer Microenviron.* 2010;3:167–76.
29. Herrera M, Islam ABMMK, Herrera A, Martin P, García V, Silva J, et al. Functional heterogeneity of cancer-associated fibroblasts from human colon tumors shows specific prognostic gene expression signature. *Clin Cancer Res.* 2013;19:5914–26.
30. Mueller L, Goumas FA, Affeldt M, Sandtner S, Gehling UM, Briloff S, et al. Stromal fibroblasts in colorectal liver metastases originate from resident fibroblasts and generate an inflammatory microenvironment. *Am J Pathol.* 2007;171:1608–18.
31. Chang HY, Sneddon JB, Alizadeh AA, Sood R, West RB, Montgomery K, et al. Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression: similarities between tumors and wounds. *PLoS Biol.* 2004;2:e7.
32. Cirri P, Chiarugi P. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am J Cancer Res.* 2011;1:482–97.
33. Beacham DA, Cukierman E. Stromagenesis: the changing face of fibroblastic microenvironments during tumor progression. *Semin Cancer Biol.* 2005;15:329–41.
34. Gout S, Huot J. Role of cancer microenvironment in metastasis: focus on colon cancer. *Cancer Microenviron.* 2008;1:69–83.
35. Orimo A, Weinberg RA. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle.* 2006;5:1597–601.
36. Qian B-Z, Pollard JW, Qian B-Z, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell.* 2010;141:39–51.
37. Sugimoto H, Mundel TM, Kieran MW, Kalluri R. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther.* 2006;5:1640–6.
38. Franci C, Takkunen M, Dave N, Alameda F, Gomez S, Rodriguez R, et al. Expression of Snail protein in tumor-stroma interface. *Oncogene.* 2006;25:5134–44.
39. Stanisavljevic J, Loubat-Casanovas J, Herrera M, Luque T, Pena R, Lluch A, et al. Snail1-expressing fibroblasts in the tumor microenvironment display mechanical properties that support metastasis. *Cancer Res.* 2015;75:284–95.
40. Alba-Castellón L, Batlle R, Francí C, Fernández-Aceñero MJ, Mazzolini R, Peña R, et al. Snail1 expression is required for sarcomagenesis. *Neoplasia.* 2014;16:413–21.
41. Chen S-Y, Shiau A-L, Li Y-T, Lin C-C, Jou I-M, Liu M-F, et al. Transcription factor snail regulates tumor necrosis factor α -mediated synovial fibroblast activation in the rheumatoid joint: snail regulates TNF α -mediated synovial fibroblast activation. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67:39–50.
42. Rowe RG, Li X-Y, Hu Y, Saunders TL, Virtanen I, de Herreros AG, et al. Mesenchymal cells reactivate Snail1 expression to drive three-dimensional invasion programs. *J Cell Biol.* 2009;184:399–408.
43. Rosivatz E, Becker K-F, Kremmer E, Schott C, Blechschmidt K, Höfler H, et al. Expression and nuclear localization of Snail, an E-cadherin repressor, in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract. *Virchows Arch.* 2006;448:277–87.
44. Liu S, Liao G, Ding J, Ye K, Zhang Y, Zeng L, et al. Dysregulated expression of Snail and E-cadherin correlates with gastrointestinal stromal tumor metastasis. *Eur J Cancer Prev.* 2014;23:329–35.
45. Jouppila-Mättö A, Tuhkanen H, Soini Y, Pukkila M, Närke-Mäkelä M, Sironen R, et al. Transcription factor Snail1 expression and poor survival in pharyngeal squamous cell carcinoma. *Histol Histopathol.* 2011;26:443–9.
46. Schulte J, Weidig M, Balzer P, Richter P, Franz M, Junker K, et al. Expression of the E-cadherin repressors Snail, Slug and Zeb1 in urothelial carcinoma of the urinary bladder: relation to stromal fibroblast activation and invasive behaviour of carcinoma cells. *Histochem Cell Biol.* 2012;138:847–60.
47. Herrera A, Herrera M, Alba-Castellón L, Silva J, García V, Loubat-Casanovas J, et al. Protumorigenic effects of Snail-expression fibroblasts on colon cancer cells. *Int J Cancer.* 2014;134:2984–90.
48. Hu W, Li C, Sun J, Feng B, Zhang D, Ma J, et al. Cancer-associated-fibroblast induces epithelial–mesenchymal transition of gastric cancer cells via activating Thy-1. *J Carcinog Mutagen.* 2014;5:1–10.
49. Peláez-García A, Barderas R, Batlle R, Viñas-Castells R, Bartolomé RA, Torres S, et al. A proteomic analysis reveals that snail regulates the expression of the nuclear orphan receptor nuclear receptor subfamily 2 Group F Member 6 (Nr2f6) and Interleukin 17 (IL-17) to inhibit adipocyte differentiation. *Mol Cell Proteom.* 2015;14:303–15.
50. Torres S, Bartolomé RA, Mendes M, Barderas R, Fernandez-Acenero MJ, Peláez-García A, et al. proteome profiling of cancer-associated fibroblasts identifies novel proinflammatory signatures and prognostic markers for colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2013;19:6006–19.
51. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. *N Engl J Med.* 1986;315:1650–9.
52. Lu C, Sun X, Sun L, Sun J, Lu Y, Yu X, et al. Snail mediates PDGF-BB-induced invasion of rat bone marrow mesenchymal stem cells in 3D collagen and chick chorioallantoic membrane. *J Cell Physiol.* 2013;228:1827–33.
53. Shields MA, Dangi-Garimella S, Krantz SB, Bentrem DJ, Munshi HG. Pancreatic cancer cells respond to Type I collagen by inducing snail expression to promote membrane type 1 matrix metalloproteinase-dependent collagen invasion. *J Biol Chem.* 2011;286:10495–504.
54. Shields MA, Krantz SB, Bentrem DJ, Dangi-Garimella S, Munshi HG. Interplay between I-integrin and rho signaling regulates differential scattering and motility of pancreatic cancer cells by snail and slug proteins. *J Biol Chem.* 2012;287:6218–29.
55. Zhang K, Corsa CA, Ponik SM, Prior JL, Piwnica-Worms D, Eliceiri KW, et al. The collagen receptor discoidin domain receptor 2 stabilizes SNAI1 to facilitate breast cancer metastasis. *Nat Cell Biol.* 2013;15:677–87.
56. Stanisavljevic J, Porta-de-la-Riva M, Batlle R, de Herreros AG, Baulida J. The p65 subunit of NF- κ B and PARP1 assist Snail1 in activating fibronectin transcription. *J Cell Sci.* 2011;124:4161–71.
57. Quante M, Tu SP, Tomita H, Gonda T, Wang SSW, Takashi S, et al. Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell.* 2011;19:257–72.
58. Li X-Y, Zhou X, Rowe RG, Hu Y, Schlaepfer DD, Ilic D, et al. Snail1 controls epithelial–mesenchymal lineage commitment in focal adhesion kinase-null embryonic cells. *J Cell Biol.* 2011;195:729–38.
59. Lee Y, Kim SH, Lee YJ, Kang ES, Lee B-W, Cha BS, et al. Transcription factor Snail is a novel regulator of adipocyte differentiation via inhibiting the expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Cell Mol Life Sci.* 2013;70:3959–71.
60. de Frutos CA, Dacquin R, Vega S, Jurdic P, Machuca-Gayet I, Angela Nieto M. Snail1 controls bone mass by regulating Runx2 and VDR expression during osteoblast differentiation. *EMBO J.* 2009;28:686–96.
61. Martin P. Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 1997;276:75–81.